

**„Reorganisation der kardialen extrazellulären Matrix bei dilatativer
Kardiomyopathie: Prognostische Bedeutung von MMP-9, TIMP-1,
ED-A⁺- Fibronektin und B⁺ Tenascin-C“**

Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Franziska Reinbothe
geboren am 24.11.1980 in Weißenfels**

Gutachter

1. Dr.med. Marcus Franz, Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena

2. apl. Prof. Dr. Alexander Berndt, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena

3. PD Dr. Torsten Hansen, Institut für Pathologie, Klinikum Lippe, Detmold

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.04.2015

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
AK	Antikörper
ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i>
ARK	<i>Animal-research-Kit</i>
ARVD	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ASMA	Alpha-glattmuskuläres Aktin
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
cLSM	<i>confocal laser-scanning-mikroscopy</i>
CRT	Kardiale Resynchronisationstherapie
CT	Computertomographie
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED-A	<i>type III homology extra domain A</i>
ED-B	<i>type III homology extra domain B</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiographie
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMB	Endomyokardbiopsie
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
EndMT	endothelial-mesenchymale Transformation
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
EPHESUS	<i>Eplerone Post-acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study</i>
EV	Enterovirus
EndZ	Endothelzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblast
Fn	Fibronektin
FSP-1	<i>fibroblast specific protein-1</i>

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HTx	Herztransplantation
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
ISFC	<i>International Society and Federation of Cardiology</i>
KHK	Koronare Herzerkrankung
KM	Kardiomyozyten
LVAD	<i>left ventricular assist device</i>
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
MHC II	<i>Major Histocompatibility II-Complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP	<i>membrane-type</i> MMP
MRT	Magnetresonanztomographie
MyoFB	Myofibroblasten
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PREMIER	<i>Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling study</i>
RALES	<i>Randomized Aldactone Evaluation Study</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
SIP	<i>Small immunoprotein</i>
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of Metalloproteinase</i>
Tn-C	Tenascin-C
TGF	<i>Tissue growth factor</i>
TGF- \uparrow 1	<i>Transforming-growth-factor-\uparrow1</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TSP	Thrombospondin
VCM	Valvuläre Kardiomyopathie
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>

WHO

World Health Organisation

IIICS

type III homology connectin segment

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	9
2.	Einleitung	12
2.1	Kardiomyopathien	12
2.2	Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)	12
2.2.1	Definition	12
2.2.2	Ursachen	13
2.2.3	Symptome	13
2.2.4	Klinische und apparative Diagnostik	14
2.2.5	Endomyokardbiopsie (EMB)	15
2.2.6	Therapie der DCM	16
2.2.7	Prognose von DCM-Patienten	16
2.2.8	Entzündlich assoziierte Kardiomyopathien	17
2.3	Die Extrazelluläre Matrix (EZM) des Herzens	18
2.3.1	Aufbau und Funktion der adulten kardialen EZM	18
2.3.2	Reorganisation der kardialen EZM im Rahmen des pathologischen myokardialen Geweberemodellings	20
2.3.2.1	Besonderheiten des myokardialen <i>Remodellings</i>	22
2.3.3	Die Bedeutung des kardialen Fibroblasten (FB)	23
2.3.4	Die Bedeutung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) für die Reorganisation der EZM	26
2.3.5	Die zellulären Adhäsionsproteine Fibronectin und Tenascin-C	29
2.3.5.1	Fibronectin (Fn)	29
2.3.5.2	Tenascin-C (Tn-C)	30
2.3.5.3	Reexpression fetaler Molekülvarianten von Fn und Tn-C	33
2.3.5.3.1	Die Bedeutung von Fn und Tn-C während der Organogenese des Herzens	33

2.3.5.3.2	Die Bedeutung von Fn und Tn-C während des physiologischen und pathologischen Geweberemodellings	34
3	Motivation und Zielstellung der Arbeit	38
4	Material und Methoden	41
4.1	Patienten	41
4.2	Endomyokardbiopsie, Echokardiographie und Laborparameter	43
4.3	Bestimmung von MMP-9, TIMP-1 und B ⁺ Tn-C im Serum	44
4.4	Immunfluoreszenzmarkierungen von ED-A ⁺ - Fn, B ⁺ Tn-C und ASMA- positiven Zellen im Gewebe	45
4.4.1	Immunfluoreszenzmarkierung von ED-A ⁺ - Fn	45
4.4.2	Immunfluoreszenzmarkierung von B ⁺ Tn-C	45
4.4.3	Immunfluoreszenzmarkierung von ASMA- positiven Zellen	46
4.5	Qualitative und quantitative Analyse der Deposition von ED-A ⁺ - Fn, B ⁺ Tn-C und ASMA im Gewebe mittels Immunfluoreszenzanalyse	47
4.6	Statistische Analyse	47
5	Ergebnisse	50
5.1	Patientencharakteristika	50
5.2	Histologische und immunhistochemische Ergebnisse der EMB	50
5.3	Expression und Gewebeverteilung von B ⁺ Tn-C, ED-A ⁺ - Fn und ASMA-positiven Zellen im Myokardgewebe	52
5.4	Analyse des Patientenkollektives hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von klinischen, laborchemischen und EZM- Parametern	54
5.5	Kaplan-Meier- Analysen zur Korrelation des Überlebens der Patienten mit den klinischen, histopathologischen sowie immunhistochemischen Daten	57

6	Diskussion	68
6.1	Die Bedeutung klinischer Parameter in der Diagnostik und für die Prognoseabschätzung der DCM	69
6.1.1	Virales Genom und Inflammation	69
6.1.2	Fibrose	72
6.2	Schlüsselparameter des kardialen EZM- <i>Remodellings</i> und ihre Bedeutung für die Prognoseabschätzung der DCM	73
6.2.1	Nachweis von B ⁺ Tn-C im Serum und im Myokardgewebe von DCM – Patienten	73
6.2.2	Die Bedeutung der Gewebedeposition von ED-A ⁺ - Fn bei Patienten mit DCM	75
6.2.3	Die Relevanz der Nachweisbarkeit von ASMA-positiven Zellen im kardialen Gewebe bei Patienten mit DCM	76
6.2.4	Die Bedeutung der Bestimmung von MMP-9 und TIMP-1 im Serum von Patienten mit DCM	77
6.3	Synopsis der Befunde: Hypothetische Betrachtungen zur Zell-Matrix-Interaktion der untersuchten Biomarker mit aktivierten Fibroblasten	81
6.4	Perspektive: Implikationen der untersuchten Parameter für Diagnostik und Therapie der DCM	87
7	Schlussfolgerungen	93
8	Literatur	94
9	Anhang	111
9.1	Danksagung	111
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	113

1. Zusammenfassung

Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine häufige Herzerkrankung, welche insbesondere durch eine systolische Dysfunktion mit fortschreitender Herzinsuffizienz charakterisiert ist. Die Ätiopathologie der Erkrankung ist komplex und der genaue Erkrankungsbeginn kann oft nicht verlässlich festgestellt werden, da Betroffene sich meist erst dann in ärztliche Behandlung begeben, wenn die Linksherzinsuffizienz klinisch relevant geworden ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die strukturelle Schädigung des Herzmuskels oft schon weit fortgeschritten. Es kommt zum sogenannten pathologischen myokardialen *Remodelling* mit einer Veränderung der Kardiomyozyten, einer Aktivierung von Fibroblasten sowie einer assoziierten strukturellen und funktionellen Reorganisation der kardialen Extrazellulären Matrix (EZM). Insbesondere lässt sich ein Wiederauftreten fetaler Molekülvarianten der Adhäsionsproteine Fibronektin (Fn) und Tenascin (Tn) beobachten. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Herzentwicklung und sind im gesunden adulten Organismus praktisch nicht nachweisbar. Sie zeigen im Rahmen pathologischer Gewebsumbauprozesse eine auffällige Reexpression. Dies qualifiziert sie als Markermoleküle des myokardialen *Remodellings* bei DCM-Patienten. Darüber hinaus sind Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie deren Inhibitoren, die *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP), von entscheidender Bedeutung für Matrixumbauprozesse am Herzen. Auf zellulärer Ebene spielt hierbei insbesondere der aktivierte kardiale Fibroblast bzw. Myofibroblast eine entscheidende Rolle. Die histopathologische Bewertung von Endomyokardbiopsien (EMB) ist im Rahmen der Diagnostik einer DCM vornehmlich deskriptiv und liefert häufig keine Informationen zur Ätiologie und insbesondere zur Prognose der Patienten. Es ist daher von hohem klinischen Interesse, die diagnostischen Verfahren dahingehend zu verbessern, dass zum einen strukturelle Herzschädigungen frühzeitiger erfasst und damit behandelt werden können, und zum anderen prognostisch relevante Aussagen bereits zum Zeitpunkt der initialen klinischen Präsentation getroffen werden können. Darüber hinaus gilt es, über ein tieferes Verständnis der DCM-assoziierten Gewebsumbauprozesse effektivere und zielgerichtete Therapien zu entwickeln. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die prognostische Bedeutung des Nachweises der EZM-Parameter MMP-9, TIMP-1, B⁺ Tn-C, ED-A⁺- Fn sowie ASMA-positiver Zellen zu untersuchen. Dies erfolgte an Serum- und Gewebeproben von 326 Patienten mit einer DCM mittels ELISA-Technik sowie Immunfluoreszenzmarkierungen mit nachfolgender

qualitativer und quantitativer Analyse unter Verwendung der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie (cLSM). Zudem wurde die Bedeutung klinischer Parameter wie Alter, NYHA-Stadium, Medikation sowie echokardiographischer Parameter untersucht und deren prognostische Aussagekraft statistisch berechnet. In einer zunächst univariaten Cox-Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass das NYHA-Stadium III/IV ($p = 0.001$), die EF ($p = 0.0001$), der LVEDD ($p = 0.038$) und die Einnahme von beta-Blockern ($p = 0.003$) statistisch signifikant waren. Von den Serumparametern waren B⁺ Tn-C ($p < 0.001$), MMP-9 ($p = 0.004$) und TIMP-1 ($p < 0.001$) statistisch signifikant. Die Analyse der Gewebeparameter der Matrixreorganisation zeigte statistisch signifikante Werte für B⁺ Tn-C ($p = 0.003$), ED-A⁺- Fn ($p = 0.005$) sowie für ASMA- positive Zellen ($p < 0.001$). Keine statistische Signifikanz bestand hingegen für den Grad der Inflammation oder der Fibrose im Gewebe sowie der Tatsache, ob virales Genom im Gewebe nachweisbar war. Unterzieht man die statistisch signifikanten Parameter aus der univariaten Analyse einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse, so zeigen sich das NYHA-Stadium ($p = 0.032$), die EF ($p = 0.009$) sowie die positive Analyse mindestens einer der drei Serumparameter ($p = 0.006$) als statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse spiegeln sich auch in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse wieder. Auch hier sind das NYHA-Stadium, die EF, die Serumparameter MMP-9, B⁺ Tn-C und TIMP-1 sowie die Gewebeparameter B⁺ Tn-C, ED-A⁺- Fn sowie die ASMA-positiven Zellen statistisch signifikant. Für die Serumparameter sowie die Gewebeparameter zeigte sich ein verbessertes Überleben, wenn der vordefinierte Grenzwert nicht überschritten wurde. Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass eine vermehrte Nachweisbarkeit aller untersuchten Marker zum Zeitpunkt der initialen klinischen Präsentation mit einer schlechteren Prognose, d.h. dem früheren Erreichen des kombinierten Endpunktes aus Tod oder Herztransplantation, assoziiert ist. Auf der Basis der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse können durch die Analyse der beschriebenen EZM-Parameter bereits initial, zum Zeitpunkt der ersten klinischen Vorstellung, Patienten mit einem rasch progredienten Krankheitsverlauf identifiziert werden. Diese Patienten sollten dann einem engmaschigen *Follow-Up* und gegebenenfalls einer frühzeitigeren intensivierten Herzinsuffizienztherapie zugeführt werden. Darüber hinaus kommt einigen der untersuchten EZM-Komponenten, insbesondere ED-A⁺- Fn und B⁺ Tn-C, eine zusätzliche Bedeutung als potenzielle molekulare *Targets* für zielgerichtete

Antikörper-basierte Diagnose- und Therapiestrategien bei Patienten mit einer DCM zu.

2. Einleitung

2.1 Kardiomyopathien

Der Begriff Kardiomyopathie umfasst verschiedene Krankheitsbilder des Herzens, die sich in Ätiologie, Pathophysiologie, klinischem Verlauf und einer möglichen Systembeteiligung unterscheiden. In den letzten 30 Jahren erschienen mehrere Definitionen des Krankheitsbegriffes. Zu den älteren Begriffsbestimmungen zählen die Definition der *World Health Organisation* (WHO) von 1980 sowie der *WHO/International Society and Federation of Cardiology (ISFC) Task Force* von 1995 (Br Heart J 1980; 44: 672-3). Die *American Heart Association (AHA)* definierte 2006 Kardiomyopathien als eine uneinheitliche Gruppe von Erkrankungen des Myokards, welche mit einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion vergesellschaftet sind und häufig mit einer ungünstigen Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern einhergehen. Zur Diagnosestellung müssen eine koronare Herzerkrankung (KHK), eine arterielle Hypertonie, Klappenerkrankungen sowie kongenitale pathologische Veränderungen ausgeschlossen werden. Kardiomyopathien liegen verschiedene Ursachen zu Grunde, häufig sind sie jedoch genetisch bedingt. Sie werden unterteilt in primäre Kardiomyopathien (vor allem auf das Herz beschränkt) und in sekundäre Kardiomyopathien (als Folge der Erkrankung eines anderen Organsystems). Aufgrund progressiver Herzinsuffizienz führen sie sukzessive zur Invalidität und oftmals zum Tod des Betroffenen (Maron et al. 2006). 2008 hat die *European Society of Cardiology's working group on myocardial and pericardial diseases* (ESC) ebenfalls eine Definition herausgegeben und betont darin die Unterscheidung zwischen genetischen und nicht genetischen Ursachen einer Kardiomyopathie (Elliott et al. 2008). Die aktuellen Krankheitsdefinitionen reflektieren einen deutlichen Zugewinn an Wissen, jedoch sind der Krankheitsverlauf und die Faktoren, die diesen beeinflussen, noch immer nicht ausreichend verstanden.

2.2 Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)

2.2.1 Definition

Die DCM beschreibt ein Erkrankungsbild des Herzens, welches strukturell durch eine Dilatation der Ventrikel bei anfangs normaler linksventrikulärer Wandstärke und funktionell durch eine vor allem systolische Dysfunktion gekennzeichnet ist (Maron et

al. 2006). Die Inzidenz beträgt 6/100000 Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz 36/100000 Einwohner/Jahr. Männer sind nahezu dreimal so häufig betroffen wie Frauen (Olbrich 2001). Ein Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr, obgleich Patienten jeden Alters eine DCM entwickeln können (Schoen 2005).

2.2.2 Ursachen

Die Ursachen einer DCM sind multifaktoriell. Zum einen kann es sich im Sinne der Definition der AHA um eine primäre Herzerkrankung und zum anderen um eine sekundäre Form handeln, welche dann mit der Erkrankung eines anderen Organsystems vergesellschaftet ist. Für die primäre DCM können die Ursachen genetisch, erworben oder gemischt sein. Erworbene oder gemischte Ursachen der DCM können u.a. Infektion, Ablagerungserkrankungen, Medikamente, Toxine, eine Myokarditis sowie eine Schwangerschaft sein. In 35-40% der Fälle gelingt es nicht, die genaue Ursache zu identifizieren. Diese Gruppe der DCM wird als idiopathische Form bezeichnet (Hershberger et al. 2010; Luk et al. 2009a). Ein Drittel bis die Hälfte dieser Fälle kann man einer positiven Familienanamnese zuordnen und somit annehmen, dass ein vererbter Gendefekt ursächlich für die Erkrankung ist. Man spricht in diesen Fällen auch von familiärer DCM. Die Vererbung erfolgt autosomal dominant, autosomal rezessiv, x-chromosomal oder mitochondrial. Die autosomal dominante Vererbung ist die häufigste Form (Fatkin 2011).

2.2.3 Symptome

Die Symptome der DCM reichen in ihrer Schwere von asymptomatischen Patienten bis hin zu manifestem Herzversagen. Im Wesentlichen wird die DCM durch die Symptome der Links-, später der globalen Herzinsuffizienz charakterisiert, welche u.a. Belastungsintoleranz, Dyspnoe oder Orthopnoe bzw. periphere Ödembildung, Halsvenenstauung, Hepatomegalie und Stauungsgastropathie umfassen. Die Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz sind prognostisch als ungünstig anzusehen. Kachexie und periphere Ödeme treten spät im Erkrankungsverlauf auf. Komplikationen sind plötzliches Herzversagen, Thrombembolien und in deren Folge Schlaganfälle sowie Herzrhythmusstörungen.

2.2.4 Klinische und apparative Diagnostik

Um die Diagnose einer DCM stellen zu können, müssen eine KHK, eine arterielle Hypertonie, eine Klappenerkrankung sowie kongenitale Herzerkrankungen ausgeschlossen werden (Richardson et al. 1996). Zum Ausschluß einer KHK wird eine Koronarangiographie durchgeführt. Zur Differenzierung zwischen primärer und sekundärer DCM müssen sekundäre Ursachen ausgeschlossen werden. Die Diagnose einer DCM wird im klinischen Alltag neben einer ausführlichen Anamnese und einer körperlichen Untersuchung mit Hilfe der Echokardiographie gestellt. Diese dient der zweidimensionalen Darstellung sowohl der Ventrikel als auch der Klappenfunktion. Darüber hinaus erlaubt diese Untersuchung eine Beurteilung einer systolischen sowie diastolischen Funktionsstörung. Neben der Echokardiographie ist auch die Magnetresonanztomographie (MRT) eine diagnostische Methode zur Darstellung der Diameter des Herzens. Das MRT kann außerdem Aussagen über die kardiale Perfusion liefern und bei Verdacht auf eine akute Myokarditis diese ggf. lokalisieren (Bello et al. 2003). Die Elektrokardiographie (EKG) ist eine unspezifische Methode im Rahmen der Diagnostik einer DCM. Die EKG-Veränderungen sind variabel und reichen von einem unauffälligen EKG bis hin zu T-Wellen-Veränderungen, intraventrikulären Leitungsverzögerungen und Blockbildern (Elliott 2000). Aufgrund der Komplexität der Genetik der familiären DCM konnte sich ein Routinescreening zur Diagnosestellung im klinischen Alltag nicht durchsetzen. Eine genetische Untersuchung hat jedoch einen Stellenwert bei einer positiven Familienanamnese. Laborchemische Untersuchungen sind sinnvoll zur Diagnostik möglicher reversibler Ursachen einer Herzinsuffizienz wie renale Genese, Erkrankungen der Schilddrüse oder Stoffwechsel- und Speichererkrankungen (Elliott 2000). In einer Übersichtsarbeit stellt Braunwald die Bedeutung von Biomarkern in der Diagnostik und Beschreibung der Herzinsuffizienz dar (Braunwald 2008). Der klinisch am meisten genutzte Biomarker ist das *brain natriuretic peptide* (BNP). Ein Anstieg des BNP reflektiert eine reduzierte linksventrikuläre systolische Funktion und Hypertrophie sowie einen erhöhten enddiastolischen Füllungsdruck und eine myokardiale Ischämie (Maisel et al. 2008). Klinisch werden die subjektiven Beschwerden des Patienten in Stadien der Herzinsuffizienz, den NYHA (*New York Heart Association*)-Stadien eingeteilt.

2.2.5 Endomyokardbiopsie (EMB)

Durch eine EMB werden Gewebeproben aus der linksventrikulären Wand entnommen, um 1) die Gewebearchitektur, den Grad der Fibrose und die Infiltration des Gewebes mit entzündlichen Zellen zu beurteilen, 2) aus der Biopsie durch molekularbiologische Methoden virales Genom nachzuweisen und zu beurteilen und um 3) Speicherkrankheiten oder eine kardiale Mitbeteiligung von Systemerkrankungen auszuschließen. Durch eine EMB kann zwischen verschiedenen Erkrankungen, die sich klinisch ähnlich im Sinne einer DCM darstellen, jedoch eine unterschiedliche Behandlung benötigen, unterschieden werden: z.B. Speicherkrankheiten, Hämochromatose, maligne Erkrankungen und Sarkoidose (Luk et al. 2009b). Die EMB wurde früher ausschließlich nach den Dallas-Kriterien beurteilt (Aretz 1987). Da diese jedoch bezüglich ihrer Beurteilung unzureichend und fehlerhaft schienen, wurden sie durch immunhistochemische Methoden sowie die PCR (*polymerase chain reaction*) ergänzt (Hauck et al. 1989; Shanes et al. 1987). Die histologisch- immunhistochemische Beurteilung erfolgt nach den WHO-Kriterien. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Auswertung der EMB kann eine feinere Beurteilung und Abgrenzung entzündlicher Infiltrate sowie die Charakterisierung der infiltrierenden Zellen erfolgen. Die Bedeutung und klinische Relevanz der EMB wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ursachen für eine kritische Haltung gegenüber der EMB sind die Subjektivität bei Erfassung und Beurteilung wichtiger Biopsiebefunde mit erheblicher Interobservervariabilität, eine fehlende Standardisierung der Entnahmetechnik von Biopsien, der Aufbereitungsmethodik und der angewandten diagnostischen Kriterien, die diagnostische Fehlbiopsie („*sampling error*“), das Fehlen gesicherter Konsequenzen für die Therapie und die Beurteilung von Verlauf und Prognose sowie potentiell schwere Komplikationen bei Durchführung der EMB (Kuhn et al. 2005). In einer Übersichtsarbeit der AHA und der ESC wurden als Reaktion auf diese Diskussion, basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft, 14 klinische Szenarien entwickelt, die anstelle von Erkrankungsbildern klinische Syndrome repräsentieren, zu denen eine Empfehlung für bzw. gegen eine EMB ausgesprochen wurde. Diese Empfehlungen sind jedoch je nach Meinung der Fachwelt und in Studien nachweisbarem Nutzen unterschiedlich validiert. Die Bedeutung der EMB bei DCM erhält die Einschätzung als gut etablierte Methode der Diagnostik, jedoch ohne ausreichend wissenschaftliche Nachweisbarkeit ihres Nutzens (Cooper et al. 2007).

2.2.6 Therapie der DCM

Die DCM ist ein heterogenes Krankheitsbild, dessen Prognose sich durch Einführung von ACE (*Angiotensin-converting-enzyme*)-Hemmern, Angiotensin-Rezeptor-Blockern und beta-Blockern in den letzten Jahren deutlich verbessert hat. Herzversagen bleibt eine sicher voraussagbare, jedoch hinsichtlich der zeitlichen Manifestation nicht abschätzbare Folge der Erkrankung. Von großem Interesse ist es deshalb, eine Möglichkeit zu finden, die Schwere der Erkrankung und die Prognose sicher abschätzen zu können, um daraus zielgerichtete Therapien abzuleiten. Die bisherigen Therapieansätze, die sich an den Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz der „Deutschen Gesellschaft für Kardiologie“ orientieren, sind symptomatisch auf die jeweiligen Beschwerden des Patienten ausgerichtet und reichen von Änderung der Lebensgewohnheiten über Herzinsuffizienztherapie, medikamentöser und nicht-medikamentöser antiarrhythmischer Therapie sowie antikoagulativer Therapie. Die Verwendung linksventrikulärer Assistsysteme (LVAD) bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz trägt zur Verbesserung der Lebensqualität und Verlängerung der Überlebenszeit bei und stellt eine alternative Methode zur Therapie ausgewählter Patienten dar, die sich nicht für eine Herztransplantation (HTx) eignen (Dandel et al. 2008; Rose et al. 2001). Die Verwendung der kardialen Resynchronisationstherapie (CRT) hat die therapeutischen Optionen zur Behandlung der DCM erweitert (Cleland et al. 2005). Die DCM ist die häufigste Ursache für eine HTx, welche als *ultima ratio* anzusehen ist (Maron et al. 2006). Im Falle von sekundären DCM-Formen steht die Behandlung der jeweiligen Grunderkrankung im Vordergrund. Experimentelle Therapieansätze wie die Immunadsorptionstherapie basieren auf der Annahme, dass autoimmunologische Prozesse mitursächlich für die Erkrankung sind (Dandel et al. 2012).

2.2.7 Prognose von DCM-Patienten

Die 5-Jahres Überlebensrate nach Diagnosestellung einer DCM beträgt 50%, da die Patienten an einem progressiven Herzversagen leiden und Komplikationen wie Thrombembolien und Arrhythmien auftreten können (Diaz et al. 1987). In der Vergangenheit wurden verschiedene Faktoren herausgearbeitet, die eine günstigere oder ungünstigere Prognose der Erkrankung voraussagen sollen. Faktoren, die für eine bessere Prognose sprechen, sind: jüngeres Alter, weibliches Geschlecht und die

Ätiologie aus Myokarditis oder Schwangerschaft (Manolio et al. 1992). Eine schlechtere Prognose ist assoziiert mit einem auskultatorischen S3 Gallop in der körperlichen Untersuchung, einer Linksschenkelblockbildung im EKG, einem vergrößerten Verhältnis zwischen Herz und Brustkorb im Röntgenbefund, einer verminderten Wandstärke ($<0,9\text{cm}$), einem verminderten Masse/Volumen Verhältnis, einem Pulmonalarteriendruck oder enddiastolischem Druck $>20\text{mmHg}$, einem Herzindex $< 2,5\text{l/min/m}^2$, einem erhöhten Plasmaspiegel von Norepinephrin und ANF (*atrial natriuretic factor*), einer erhöhten Reninaktivität, einer verminderten Ejektionsfraktion (EF) sowie einem fortgeschrittenen NYHA- Stadium (Manolio et al. 1992; Shah 1988). Die beschriebenen klinischen Beobachtungen als auch die Erkenntnisse aus der EMB eignen sich jedoch nicht ausreichend zur Abschätzung der Prognose der DCM. Zudem treten klinische Symptome häufig erst dann auf, wenn bereits eine irreversible Schädigung des Herzmuskels eingetreten ist. Faktoren zur Risikostratifizierung der DCM wären jedoch von ausgesprochener Wichtigkeit für die Behandlung der Patienten, da durch eine frühe, adäquate Therapie der bisher unausweichliche Krankheitsprogress hin zur symptomatischen Herzinsuffizienz oder zur HTx abgemildert oder aufgehalten werden könnte. Neben einer Verbesserung der Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten hat die Notwendigkeit prognostischer Aussagen auch wesentliche sozio-ökonomische Aspekte.

2.2.8 Entzündlich assoziierte Kardiomyopathien

Da die DCM verschiedene inflammatorische und infektiöse Charakteristika mit der Myokarditis teilt, ist sie von dieser teilweise schwer zu unterscheiden. Die Bedeutung der Inflammation bzw. die Bedeutung des Virusgenoms für die DCM wird in der Fachwelt kontrovers diskutiert und soll in dieser Arbeit nur übersichtsartig beschrieben werden. Von einer fortbestehenden Myokarditis spricht man nach Dallas-Kriterien, wenn eine Entzündung persistiert und wenn bereits im Vorfeld ein akuter Krankheitsprozess mittels Biopsie nachgewiesen werden konnte. Da aus ethischen Gründen oftmals nicht wiederholt Biopsien entnommen werden, kann man jedoch genau genommen nach Dallas-Kriterien nicht von einer fortbestehenden Myokarditis sprechen. Man hat anstelle dessen in den WHO/ISFC- Kriterien die Diagnose einer inflammatorischen DCM aufgenommen. Auch in der letzten Definition der AHA, *Contemporary Definitions and Classification of Cardiomyopathies* wird diese beschrieben (Maron et al. 2006). Die Gleichstellung des Begriffs der

inflammatorischen Kardiomyopathie mit der Bezeichnung Myokarditis einschließlich der weiteren bioptischen Differenzierung der Myokarditis/inflammatorische Kardiomyopathie ist bisher methodisch wie klinisch nicht adäquat validiert (Kuhn et al. 2005). Bei bis zu 60% der Patienten mit einer DCM lässt sich virales Genom nachweisen (Kuhl et al. 2005). Es wird jedoch in der Fachwelt auch die Position vertreten, dass der Nachweis viralen Genoms bei DCM ein Epiphänomen darstellt (Okuno et al. 1989; Woolf et al. 1989). Die Tatsache, dass bei einer DCM als auch bei einer Myokarditis ein Virusnachweis gelingt, führt zu der Schlussfolgerung, dass eine virale Infektion ursächlich für eine Myokarditis und in deren Folge zu dem Bild einer DCM führen kann. Der Übergang einer bioptisch diagnostizierten „chronischen Myokarditis“ in eine DCM ist bisher jedoch nicht ausreichend belegt (D'Ambrosio et al. 2001; Mason 2003). Zusammenfassend ist zu sagen, dass uns der Virusnachweis in der EMB bezüglich einer Aussage über die Prognose der DCM nur unsichere Angaben zu machen scheint. In verschiedenen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass der Nachweis viralen Genoms bei DCM-Patienten keinen Einfluss auf Prognose oder LV-Funktion hatte (Kindermann et al. 2008; Kuethe et al. 2007).

2.3 Die Extrazelluläre Matrix (EZM) des Herzens

2.3.1 Aufbau und Funktion der adulten kardialen EZM

Die EZM wird allgemein verstanden als Gesamtheit der Makromoleküle außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Organen und Geweben. Sie setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der Grundsubstanz und den Faserproteinen. Hauptbestandteil der wasserhaltigen Grundsubstanz sind Proteoglykane. Aufgrund ihrer Permeabilität für Zytokine, Nährstoffe und Stoffwechselprodukte, nicht jedoch für Makromoleküle und korpuskuläre Bestandteile, stellt sie die Grundlage für Diffusionsprozesse dar, die in den Interzellularspalten ablaufen. Zu den Faserproteinen, die geflechtartig in die Grundsubstanz eingelagert sind, gehören die Strukturproteine Kollagen (insbesondere die Kollagen I, III und IV), Laminin (insbesondere Laminin 221 und 121), Fibronektin (Fn), Tenascin-C (Tn-C) sowie verschiedene Proteasen, Wachstumsfaktoren und Zytokine. Weiterhin bildet die kardiale EZM ein großes Reservoir für bioaktive Moleküle wie Angiotensin II und Endothelin-1 (Dell'Italia et al. 1997; Ergul et al. 2000). Die beiden vorherrschenden Zelltypen des kardialen Gewebes sind, neben Endothelzellen (EndZ),

Kardiomyozyten (KM) und Fibroblasten (FB). Strukturell besteht das Myokard aus Myozytenlaminae von einer Stärke von zwei bis fünf Zellen. Diese Myozytenlagen umgibt ein Kollagennetzwerk, in dem kardiale FBs mit KMs verbunden sind. EndZs und glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) sind größtenteils den koronaren Gefäßen zugeordnet (Camelliti et al. 2005). Neben VSMCs, EndZs sowie Leukozyten produzieren die KMs und die FBs die Bestandteile der EZM. KMs synthetisieren beispielsweise Proteoglycane und Kollagen-Typ VI (Jane-Lise et al. 2000). FBs produzieren unter anderem Matrixmetalloproteinasen (MMPs), ihre endogenen Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) sowie TGF (*Transforming growth factor*) -beta und TNF (Tumornekrosefaktor) - alpha (Baudino et al. 2006; Manabe et al. 2002). Die kardiale EZM ist kein statisches Gebilde. In Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Umbauprozessen des Gewebes variiert die Komposition der EZM qualitativ und quantitativ. So ändert sich zum Beispiel die Zusammensetzung der kardialen EZM in Abhängigkeit vom Stadium der Organogenese des Herzens (Bowers et al. 2010). Die EZM spielt eine bedeutende Rolle für die Interaktion verschiedener Zellpopulationen des Herzens, im speziellen die Interaktion zwischen FBs, KMs und EndZs. Veränderungen der Komposition der EZM haben direkten Einfluss auf die Zelladhäsion und -migration sowie die zelluläre Kommunikation im Allgemeinen (Bowers et al. 2010). Ein geordnetes Zusammenspiel der EZM-Komponenten sowie der Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen gewährleistet die Vermittlung mechanischer, elektrischer und chemischer Signale während der physiologischen Regulation von Wachstum und Differenzierung, der Aufrechterhaltung einer regelrechten Funktion des kardialen Gewebes sowie während der Reorganisation der EZM im Rahmen des pathologischen kardialen *Remodellings* (Bowers et al. 2010). Strukturell und funktionell vorherrschende Komponenten der kardialen EZM sind Kollagene, Integrine, MMPs, TIMPs, Periostin, Matrikine, Zytokine, Laminin, Fn und Tn-C. Auf die Bedeutung von MMPs, TIMPs, Fn und Tn-C soll in folgenden Kapiteln gesondert eingegangen werden. Zunächst werden jedoch Kollage in ihrer Bedeutung und ihrer Rolle für die Fibroseentwicklung kurz beschrieben.

Kollagene

Die Kollagene der kardialen EZM werden hauptsächlich durch FBs bzw. MyoFBs gebildet. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil der EZM und entscheiden über die Zugfestigkeit des Gewebes und die Fähigkeit zur Fibrillogenese (Graham et al. 2007).

Verschiedene Typen von Kollagen werden während verschiedener Stadien der Organogenese sowie des Geweberemodellings gebildet. Genetische Defekte in einigen Kollagenen führen zu Herzklappenfehlern und entsprechender Dysfunktion (Peacock et al. 2008). Innerhalb des Herzens zeigt sich eine unterschiedliche Verteilung von Kollagentypen abhängig von der für die Herzfunktion notwendigen Gewebesteifigkeit und Kontraktilität (Peacock et al. 2008). Dabei sind Kollagen Typ I und III die vorherrschenden Kollagentypen (Weber 1989). Da die verschiedenen Kollagenvarianten unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, entscheidet besonders das Verhältnis ihres Vorkommens über die Funktionen und Eigenschaften des Gewebes. So ist nicht nur die quantitative Zunahme von Kollagen entscheidend für die Gewebefunktion, sondern ebenso das Verhältnis der Kollagentypen untereinander (Bowers et al. 2010). In verschiedenen Tiermodellen und auch Patientenstudien wurde eine Veränderung der Komposition und der Verknüpfung der Kollagentypen während fibrotischer Umbauprozesse am Herzen beschrieben (Chapman et al. 1990; Mukherjee et al. 1991). Die elektrischen Eigenschaften des Herzmuskels und die damit im Zusammenhang stehenden, durch Connexine vermittelten Interaktionen zwischen FBs und KMs werden durch die Komposition und räumliche Organisation des Kollagennetzwerkes bestimmt (Camelliti et al. 2005; Kohl et al. 2005). Die Synthese, Organisation und Deposition von Kollagen wird wesentlich von FBs beeinflusst, weshalb dieser Zelltyp von entscheidender Bedeutung sowohl für die Organogenese und Wundheilung, als auch für myokardiale Fibrosierungsprozesse im Rahmen des pathologischen kardialen Geweberemodellings ist (Bowers et al. 2010). Während pathologischer *Remodelling*prozesse im Rahmen kardialer Erkrankungen wird Kollagen in erhöhtem Umfang durch MMPs abgebaut und durch fibrinöse Ablagerungen in Form von schlecht verknüpften Kollagenfasern ersetzt, wodurch es zur Dilatation der Ventrikel kommt (Gunja-Smith et al. 1996).

2.3.2 Reorganisation der kardialen EZM im Rahmen des pathologischen myokardialen Geweberemodellings

Unter *Remodelling* versteht man im Allgemeinen Veränderungen in der räumlich-strukturellen Gewebearchitektur des Myokards, welche es dem Herzen ermöglichen, sich an veränderte mechanische, chemische und elektrische Stimuli anzupassen (Brower et al. 2002; Chancey et al. 2002; Stewart et al. 2003). Sowohl zelluläre als auch

nicht-zelluläre Komponenten des Herzens sind in diesen Prozess involviert. Zum einen beschreibt *Remodelling* einen physiologischen Prozess während der Organogenese oder der Entwicklung vom neonatalen zum adulten Herzen. Zum anderen tritt *Remodelling* unter pathologischen Veränderungen des Herzens wie Dilatation, Hypertrophie oder Ischämie erneut auf. Die Veränderungen der EZM während des kardialen *Remodellings* korrelieren mit einer veränderten Herzfunktion (Baudino et al. 2006). Klinisch versteht man unter kardialen *Remodelling* eine Veränderung der Größe des linken Ventrikels, assoziiert mit progressiver Herzinsuffizienz nach einer Herzschrägung bzw. Erkrankung des Herzens (Imanaka-Yoshida et al. 2004). Grundsätzlich kommt es während des kardialen *Remodellings* zu 1) einem Abbau vorbestehender EZM-Strukturen durch matrixdegradierende Enzyme, 2) einer Neusynthese von EZM Komponenten, insbesondere von Kollagen, 3) einem Wiederauftreten funktional bedeutender embryonaler Matrixproteinvarianten, welche sonst so im gesunden adulten Herzen nicht vorkommen und 4) einer strukturellen Reorganisation der neugebildeten EZM. Für das kardiale *Remodelling* spielt der FB eine herausragende Rolle. Dieser Zelltyp ist sowohl Ursprung als auch Ziel verschiedener Stimuli, die bedeutsam für die Koordination chemischer, mechanischer und elektrischer Signale zwischen zellulären und azellulären Komponenten des Herzens sind. Zu seinen Aufgaben gehören die Proliferation, Migration und Myofibroblastendifferenzierung sowie die Matrixneusynthese als auch – degeneration und die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Souders et al. 2009). Da der FB neben EZM-Deposition und *Remodelling* auch eine bedeutende Rolle für die chemische und mechanische Signalübertragung spielt, wurde er als „*sentinel cell*“ bezeichnet (Silzle et al. 2004; Smith et al. 1997). Im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen kommt es zu einer Imbalance zwischen Synthese und Degradation von EZM-Komponenten. Als Reaktion auf den stattfindenden Untergang von Zellen infolge von pathologischen Einflüssen auf das Gewebe, wie dem Myokardinfarkt, verändern die überlebenden KMs ihre Zell-Zell- bzw. Zell- EZM Interaktionen, was ebenfalls zum kardialen *Remodelling* führt (Matsushita et al. 1999). Es kommt zur vermehrten Ausschüttung von Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren und damit zur Myofibroblastenproliferation und –migration sowie zur Sekretion von MMPs und Kollagenen. FBs sezernieren ebenfalls Wachstumsfaktoren, Zytokine, im besonderen IL-1beta, IL-6 und TNF-alpha, wodurch es zur vermehrten Expression von MMPs kommt und damit zur gesteigerten

Degradation von EZM. An der Kollagensynthese sind neben den beschriebenen Einflussfaktoren auch mechanische Belastungen als Trigger der FBs sowie parakrine und neuroendokrine Faktoren beteiligt (Souders et al. 2009). Durch pathologisches *Remodelling* kommt es zur Fibrose und sukzessive zur Herzinsuffizienz. Die Herzinsuffizienz unterscheidet sich von Patient zu Patient innerhalb einer Erkrankungsentität hinsichtlich Schwere, Phänotyp und Prognose. Dies spiegelt die individuellen intrinsischen als auch extrinsischen Faktoren der Ätiologie sowie die Unterschiede im Verlauf der Erkrankung wieder. Möglicherweise wirken kardiale FBs verändernd auf den Erkrankungsverlauf und könnten somit als prädiktiver Faktor bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz herangezogen werden (Baudino et al. 2006).

2.3.2.1 Besonderheiten des myokardialen *Remodellings*

Histologisch stellt sich das Bild einer DCM vielseitig dar. Ein Teil der Myozyten zeigt eine deutliche Größenzunahme und unregelmäßig geformte, hyperchromatische Kerne (Rowan et al. 1988). Andere Myozyten erscheinen schmal und verlängert mit einem Kern, der fast den gesamten Raum des Myozyten einnimmt, andere wiederum erscheinen leer. Letztere sind Myozyten ohne Myofibrillen, deren Auftreten direkt mit dem Grad der kardialen Dilatation und der Schwere der Symptomatik korreliert. Insgesamt ist neben der Myozytenveränderung der Anteil kontraktiler Myofibrillen im Gewebe reduziert (Manolio et al. 1992). Morphometrische Studien konnten eine Verminderung der Anzahl und des Aufbaus von Kollagenfasern zwischen benachbarten Myozyten bei Patienten mit DCM zeigen (Weber et al. 1988). Weiterhin konnte im Plasma von Patienten mit DCM eine erhöhte Anzahl von Kollagenabbauprodukten als Zeichen eines erhöhten *Matrix-Turnovers* mit prognostischem Einfluss gefunden werden (Klappacher et al. 1995; Schwartzkopff et al. 2002). In *Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function* unterscheidet Spinale F. zwischen verschiedenen Verlaufsformen des kardialen *Remodellings* bei verschiedenen Formen der DCM (Spinale 2007). Er differenziert idiopathische, ischämische und infektiöse/inflammatorische DCM. Trotz beschriebener Verschiedenheiten im *Remodelling*verlauf dieser DCM-Formen arbeiten die Autoren folgende Gemeinsamkeiten heraus 1) Bei der DCM kommt es zur Zerstörung des normalen EZM-Netzwerkes, woraus eine progressive linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion resultiert und 2) Es existiert ein kontinuierlicher, regional spezifischer

und ständig ablaufender, vielseitiger Prozess der kardialen EZM-Synthese, und -Akkumulation sowie des EZM-Abbaus.

2.3.3 Die Bedeutung des kardialen Fibroblasten (FB)

Kardiale FBs stellen die größte Zellpopulation im Myokard dar. So machen FBs etwa zwei Drittel des Gewebavolumens aus, KMs hingegen ein Drittel (Camelliti et al. 2005). Sie sind die Hauptquelle der Komponenten der EZM, die Einfluss auf die Herzstruktur sowie auf die mechanische, chemische und elektrische Signalübertragung haben und bilden darüber hinaus biochemische Mediatoren wie Wachstumsfaktoren und Proteasen (Porter et al. 2009; Souders et al. 2009). FBs sind mesenchymalen Ursprungs und kommen in jedem Gewebe des Körpers vor (Krenning et al. 2010; Souders et al. 2009). Während der Embryonalentwicklung entwickeln sich kardiale FBs zum einen im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen Transformation (EMT) aus Epithelzellen (FBs des Anulus fibrosus und des Interstitiums) und zum anderen im Rahmen der endothelial-mesenchymalen Transformation (EndMT) aus EndZ (valvuläre FBs) (Zeisberg et al. 2010). Nach Abschluß der Embryonalentwicklung befinden sie sich in einem Ruhestadium. Kardiale Gewebeschädigung bewirkt die Amplifikation residenter Myofibroblasten (MyoFB) bzw. die Transformation von Endothel- bzw. Epithelzellen zu FBs und/oder die Rekrutierung von Knochenmarkszellen (Monozyten, Fibrozyten) mit nachfolgender Differenzierung dieser zu FBs oder MyoFBs (Krenning et al. 2010). Nach Myokardinfarkt stellen Knochenmarkszellen eine große Anzahl von kardialen FBs und MyoFBs im Infarktgebiet, d.h. in Arealen von untergegangenen Myozyten, bereit (Mollmann et al. 2006; van Amerongen et al. 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Zellen auch im Modell der autoimmunen Myokarditis und bei der hypertensiven Herzerkrankungen einen großen Teil der FBs und MyoFBs ausmachen (Kania et al. 2009; Zeisberg et al. 2007). Der Vorteil der Rekrutierung von FBs aus vielfältigen Quellen während pathologischer Prozesse liegt möglicherweise in der schnellen Bereitstellung von FBs für die betroffene Region (Zeisberg & Kalluri 2010). FBs unterschiedlicher Gewebe haben unterschiedliche Funktionen und Eigenschaften (Fries et al. 1994; Souders et al. 2009). Kardiale FBs sind in eine Reihe von Herzfunktionen involviert. Sie spielen für das Gleichgewicht und das *Remodelling* der EZM eine herausragende Rolle (Brilla et al. 1993; Weber 1997). Die kardiale Struktur und Funktion sowie die biochemischen und elektrischen

Eigenschaften des Herzens werden wesentlich durch diesen Zelltyp geprägt (Souders et al. 2009). FBs sind mit Myozyten durch *gap junctions* und Connexine verbunden, wodurch die Übertragung elektrischer Signale gewährleistet wird (Baudino et al. 2006). Die vorrangige Funktion von FBs ist die Produktion von Strukturproteinen der EZM (Eghbali 1992). Die Fibrose ist ein nicht-physiologischer Reparaturprozess des Gewebes, welcher mit einer exzessiven Ablagerung von EZM einhergeht und zur Beeinträchtigung der Organfunktion führt (Zeisberg et al. 2013). Die meisten kardialen Erkrankungen gehen mit einer vermehrten Fibrose einher, welche auf die Herzfunktion und -struktur eine ungünstige Wirkung hat (Souders et al. 2009). Ein Überschuss an Kollagenablagerung und Fibrose konnte klar mit myokardialer Gewebesteifigkeit und systolischer sowie diastolischer Dysfunktion in Verbindung gebracht werden (Diez et al. 2002). Aus FBs werden infolge bestimmter Stimuli, meistens myokardialer Gewebeschädigung, u.a. TGF- β , Zytokine, Komponenten der EZM, Wachstumsfaktoren und MyoFBs gebildet (Tamaoki et al. 2005; Walker et al. 2004). Diese nicht erregbaren Zellen sind mobiler, kontraktiler und ein wichtiger Zelltyp, der während der Fibrose lokal akkumuliert und EZM-Komponenten wie Fn, MMPs, jedoch hauptsächlich Kollagen produziert und extrazellulär deponiert (Brown et al. 2005; Gabbiani 2003). MyoFBs sind maßgeblich am kardialen *Remodelling* beteiligt und von besonderer Bedeutung für die Wundheilung (Gabbiani 1996). Die Transformation kardialer FBs zu MyoFBs verschiebt den EZM-Umsatz in Richtung vermehrter Synthese und Akkumulation fibrotischer Ablagerungen, welche im Sinne der *Replacement*fibrosierung untergegangene Myozyten ersetzen und/oder die Myozyten-Myozyten-Interaktion im Myokard unterbrechen können. Dies resultiert in einer übergreifenden kardialen Dysfunktion. Mit Ausnahme der Herzklappen werden MyoFBs in gesundem Herzgewebe nicht gefunden (Souders et al. 2009). Sie sind vor allem an Orten der Gewebeschädigung, wo die Synthese und Ablagerung von Kollagen zu Narbenbildung und Fibrose führt, oder in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert (Sun et al. 2000). Narbengewebe enthält neben EZM-Komponenten und Kollagen auch MyoFBs (Gurtner et al. 2008). Im Tiermodell nach Myokardinfarkt und in menschlichem Herzgewebe *post mortem* konnten noch über Monate bzw. Jahre MyoFBs nachgewiesen werden (Jugdutt 2003; Sun & Weber 2000; Willems et al. 1994). Warum kardiale MyoFBs im Gegensatz zu dermalen MyoFBs persistieren, ist nicht bekannt (Porter & Turner 2009). Dermale MyoFBs werden nach Abschluss der Wundheilung durch Apoptose abgebaut (Desmouliere et al. 1995). Die Persistenz

kardialer MyoFBs könnte zur gesteigerten Narbenbildung sowie Fibrose beitragen und das pathologische kardiale *Remodelling* sowie die daraus resultierende kardiale Dysfunktion bzw. Insuffizienz direkt beeinflussen (Frangogiannis 2006; Sun & Weber 2000). Da MyoFBs kontraktile Proteine wie alpha-glattmuskuläres Aktin (ASMA) exprimieren, können sie mechanischen Druck an die gesamte EZM weitergeben und so zur Wundheilung und Narbenbildung beitragen (Gabbiani 2003). Die Bildung von ASMA ist ein Zeichen für die Fibroblastenaktivierung während der kardialen Fibrose, weswegen der Begriff MyoFB und aktivierter FB synonym verwendet werden (Weber 1997; Zeisberg & Kalluri 2013). MyoFBs als auch VSMCs exprimieren ASMA, welches normalerweise in ruhenden kardialen FBs nicht vorhanden ist. ASMA ist somit ein Markermolekül von MyoFBs, dem vorherrschenden Zelltyp der Fibrose (Leask 2010). Dies konnte bereits eindrucksvoll durch unsere Arbeitsgruppe im Tiermodell zur chronischen Rejektion nach Herztransplantation beschrieben werden (Franz et al. 2010b).

Aufgrund der außerordentlichen Bedeutung von FBs und MyoFBs für kardiale *Remodelling*- und Fibroseprozesse sind diese in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen zur Inhibition FB- und MyoFB- vermittelter EZM- bzw. Kollagensynthese gerückt. Aktuell existieren jedoch noch keine solchen zielgerichteten Therapien. Die medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern, Angiotensin-Rezeptor-Blockern, \downarrow -Blockern, Statinen und Thiazolidinen reduziert, zumindest teilweise ansetzend am kardialen FBs, Effekte des pathologischen kardialen *Remodellings* (Porter & Turner 2009). Gründe können in der ausgesprochenen Heterogenität, den vielseitigen Interaktionen und Funktionen sowie der unterschiedlichen Herkunft des FB gesucht werden (Krenning et al. 2010; Zeisberg et al. 2007). Eine genaue Untersuchung des FB gestaltete sich bisher schwierig, da es keinen spezifischen Marker für alle Arten von FBs gibt. Neben ASMA, spezifisch für aktivierte FBs und VSMCs, existieren noch weitere FB-Marker (Zeisberg & Kalluri 2010). Vimentin ist ein Protein der intermediären Filamente in FBs und ein hoch sensibler Marker zur Charakterisierung dieser (Wilke et al. 1995). Vimentin eignet sich jedoch auch als Marker anderer Zelltypen, u.a. von EndZs und myoepithelialen Zellen (Ausma et al. 1995; Camelliti et al. 2005; Goldsmith et al. 2004). Der *Discoidin Domain Receptor 2* (DDR2) soll ein spezifischerer Marker von kardialen FBs sein, da dieser nicht von KMs oder kardialen EndZs exprimiert wird, jedoch u.a. auch bei VSMCs und Fibrozyten vorkommt (Goldsmith et al. 2004). FSP (*Fibroblast-specific-*

protein)-1 dient ebenfalls zum Nachweis von FBs, obgleich nur ein Teil der existierenden FBs unter Verwendung von FSP1-Antikörpern detektiert werden kann (Zeisberg et al. 2007). Periostin, ein matrizelluläres Protein, wird durch FBs gebildet, kann jedoch aufgrund der Tatsache, dass es ein extrazelluläres Protein ist, nicht zur antikörpervermittelten Markierung verwendet werden (Weber 1997). Ein therapeutischer als auch wissenschaftlicher Anknüpfungspunkt direkt am kardialen FB ist mit Sicherheit vielversprechend, jedoch aktuell noch wenig zielgerichtet und muß Inhalt weiterer Untersuchungen bleiben. Möglicherweise könnte ein therapeutischer als auch wissenschaftlicher Fokus dem FB „nachgeschaltet“ liegen, nämlich direkt an Interaktionspartnern der EZM und zugleich Produkten des FBs, nämlich MMPs, TIMPs, Fn, Tn-C sowie an aktivierten FBs.

2.3.4 Die Bedeutung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) für die Reorganisation der EZM

MMPs sind zinkabhängige Enzyme mit einer hohen Affinität zu Komponenten der kardialen EZM. Sie sind die treibende Kraft beim Abbau der EZM während des pathologischen und physiologischen *Remodellings* (Dollery et al. 1995). Eine Erhöhung der kardialen MMP-Aktivität führt zum Abbau von fibrillärem Kollagen, *Remodelling* der EZM und sukzessive zur Herzinsuffizienz (Li et al. 2000). Die Wirkung von MMPs ist nicht herzspezifisch, sondern entfaltet sich bei den meisten entzündlichen, degenerativen und im speziellen malignen Prozessen, welche mit einer gesteigerten Synthese, Degradation und gestörten Reifung sowie Organisation der EZM einhergehen (Spinale 2007).

Bisher wurden ca. 25 MMPs im humanen System identifiziert, welche je nach Löslichkeit in zwei, nämlich in membrangebundene und nicht-membrangebunden und nach Struktur und Substratspezifität in neun Untergruppen unterteilt werden können. MMPs werden in Form von Proenzymen synthetisiert und in den Extrazellularraum in Form von pro-MMPs sezerniert. Das Proenzymmolekül ist strukturell in 3 Domänen gegliedert: das N-terminale Propeptid, eine katalytische Region und der C-terminale Teil. Die pro-MMPs binden an spezifische Proteine der EZM und bleiben enzymatisch inaktiv bis die Propeptid-Domäne abgespalten wurde (Kukacka et al. 2005). Serinproteasen wie Plasmin und andere MMP-Isoformen sind in der Lage, inaktive pro-MMPs in aktive Enzyme zu überführen (Lijnen et al. 1998; Li et al. 2000). Durch die inaktiven, latent im Gewebe vorhandenen MMPs kann es zur

raschen MMP-Amplifikation nach enzymatischer Aktivierung kommen. Die katalytische Domäne der verschiedenen MMP-Isoformen gestaltet sich sehr ähnlich. Die Substratspezifität wird durch das C-terminale Ende bestimmt, auf dessen Basis ein MMP-Molekül nur an bestimmte EZM-Komponenten bindet und als pro-MMP bis zur Aktivierung dort gebunden bleibt. Eine lokale Aktivierung von MMP kann auch durch die Bindung an Kollagene erfolgen. Die Präsenz von löslichem Kollagen stimuliert Kollagenasen und fördert deren Aktivität (Tyagi et al. 1996). Eine exemplarische Darstellung der MMP-Molekülstruktur findet sich in **Abbildung 1**.

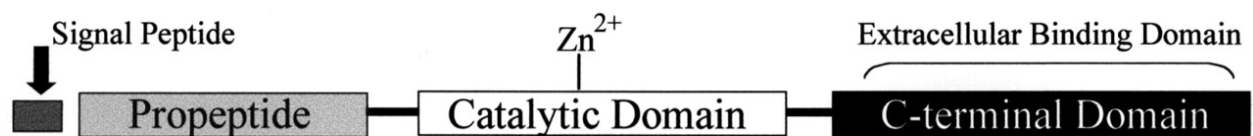


Abb.1 Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Domänenstruktur des MMP-Enzyms. Die katalytische Domäne enthält eine hochkonservierte Zink-bindende Region, welche von großer Bedeutung für die enzymatische Aktivität ist. Die C-terminale Region ist für jede MMP-Unterform einzigartig. Sie bindet extrazelluläre Proteine und trägt zur Spezifität des Enzyms bei (Spinale et al. 2000a).

Neben den nicht-membrangebundenen MMPs existieren membrangebundene MMPs (*membrane-type* MMPs, MT-MMPs), welche vollständig aktiv sind. Sie besitzen eine extrazelluläre katalytische Domäne, eine transmembrane Domäne und eine intrazelluläre Domäne (Sato et al. 1994). MT-MMPs scheinen nicht unter der Kontrolle lokaler Regulationsmechanismen wie der durch TIMPs zu stehen (Spinale 2002). Sie sind jedoch zur lokalen MMP-Aktivierung befähigt (Butler et al. 1997; Nagase 1997). Es ist bekannt, dass MT1-MMP MMPs im Myokard aktivieren (Spinale et al. 2000a). Im Herzen kommen vor allem MMP-1, MMP-13, MMP-8, MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-7 und MMP-14 vor und können von Myozyten, FBs, VSMCs, EndZs und Makrophagen sezerniert werden. Die Gelatinasen MMP-9 und MMP-2 sind dazu in der Lage, u.a. Kollagen (Typ IV, V,VII), Elastin, Laminin, Fn, Plasminogen und Proteoglykane zu spalten (Spinale 2007). MMPs führen zur Denaturierung und Degradation von Kollagen, welches durch fibröse interstitielle Ablagerungen schlecht vernetzten Kollagens ersetzt wird, was zur Dilatation der Ventrikel bzw. zur Dysfunktion des Herzens führt (Gunja-Smith et al. 1996; Li et al. 2001). Des Weiteren führt eine Aktivierung von MMPs zur vermehrten Proteolyse von EZM-Komponenten und zu Myozytenverlust. In Studien konnte gezeigt werden, dass MMP-9 im Endstadium von Patienten mit DCM signifikant erhöht war (Li et al. 1998; Spinale et al.

2000b). Zudem konnte in einer Analyse im Rahmen der *Framingham*-Herzstudie belegt werden, dass erhöhte MMP-9-Plasma-Spiegel mit einem signifikant erhöhten Risiko für nachteiliges linksventrikuläres *Remodelling* verbunden sind (Sundstrom et al. 2004a). Anhand einer Tierstudie an Schweinen konnte gezeigt werden, dass eine MMP-Inhibition zu einer Minderung der linksventrikulären Dilatation und Besserung der linksventrikulären Pumpfunktion führte (Spinale et al. 1999). Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der MMPs für das pathologische Geweberemodelling bei DCM. Während der Umbauprozesse der EZM spielen eine Reihe von Faktoren eine Rolle, die die Aktivierung als auch Inhibition der MMPs regulieren. Deshalb ist nicht nur das Vorhandensein von MMPs für das pathologische kardiale *Remodelling* bedeutsam, sondern auch das fein abgestimmte System aus Inhibition und Aktivierung, welches in klinischen Studien zunehmend als Anknüpfungspunkt innovativer therapeutischer Interventionen zur Behandlung der DCM avanciert (Hudson et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass bioaktive Moleküle wie Angiotensin II und Endothelin, Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) und IL1- \uparrow sowie matrizelluläre Faktoren wie Osteopontin (OPN) und Thrombospondin (TSP) zur Aktivierung von MMPs führen (Spinale 2007). Weiterhin konnte in mehreren Studien der duale Einfluss von TGF beschrieben werden. Diese können zum einen zur Reduktion als auch Stimulation der MMP-Transkription führen (Hall et al. 2003; Uria et al. 1998). Der am besten verstandene fördernde Einfluss auf die MMP-Transkription ist die mechanische Stimulation (MacKenna et al. 2000). Die beschriebenen Faktoren arbeiten nicht einzeln, sondern zusammen innerhalb eines dynamischen Systems während der *Remodelling*prozesse des Herzens. In welchem Umfang die Faktoren ihren Einfluss ausüben, ist von der Herzerkrankung (z.B. Myokardinfarkt versus DCM) abhängig. Die endogene Kontrolle der MMP erfolgt zum einen durch Autokatalyse und zum anderen durch spezifische MMP-Inhibitoren, die TIMPs. Auch für α_2 -Makroglobulin wurden MMP-inhibitorische Funktionen beschrieben (Woessner 1999). Von den 4 existierenden TIMP Formen sind TIMP-1 und TIMP-2 am besten untersucht. TIMPs sind niedermolekulare Proteine, die mit aktivierten MMPs eine nonkonvalente Bindung hoher Effektivität in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingehen können. TIMPs binden mit hoher Bindungsaffinität an die katalytischen Domänen der MMP-Moleküle und verhindern damit den Zugang zu Substraten und binden ebenso an pro-MMP, wodurch ihre Aktivierung behindert wird. Spezifische TIMPs binden bevorzugt an spezifische MMP-Moleküle. TIMP-1 bindet

bevorzugt an MMP-1 und MMP-9 (Nagase 1997; Ries et al. 1995). Mit ihrer Fähigkeit, die Aktivität von MMP direkt zu beeinflussen, spielen TIMPs eine bedeutende Rolle im kardialen Geweberemodelling. Während verschiedene MMP-Isoformen während einer DCM erhöht scheinen, konnten für TIMPs im Rahmen dieses Krankheitsbildes erniedrigte Spiegel nachgewiesen werden (Li et al. 1998; Thomas et al. 1998). Die Studie von Li et al. stellte heraus, dass TIMP-1- und MMP-9-Spiegel gegensätzlich reguliert werden, also eine *Downregulation* von TIMP-1 mit einer *Upregulation* von MMP-9 einhergeht (Li et al. 1998). In einer Studie von Spinale et al. konnte jedoch auch gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer DCM erhöhte MMP-9-Spiegel ohne gleichzeitigen Anstieg von TIMP-1 auftreten, woraus eine Betonung der proteolytischen Aktivität von MMP und eine Abnahme von MMP-9/TIMP-1-Komplexen während des kardialen Remodellings resultiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Verhältnis von MMP zu TIMP von besonderer Bedeutung für das kardiale Remodelling ist (Spinale et al. 2000b).

2.3.5 Die zellulären Adhäsionsproteine Fibronektin und Tenascin-C

2.3.5.1 Fibronektin (Fn)

Fn ist ein makromolekulares dimeres Molekül, welches sich aus zwei nahezu identischen Untereinheiten mit einer Größe von etwa 250 kDa zusammensetzt. Jede Untereinheit besteht aus sich wiederholenden homologen Sequenzen in Form von Typ-I, Typ-II und Typ-III *repeats*, wodurch globuläre Domänen entstehen, welche zur Bindung an verschiedenste Liganden wie Kollagen, Fn oder Zelloberflächenrezeptoren befähigt sind (White et al. 2008). Es sind bis zu 20 verschiedene Fibronektinvarianten bekannt (Schwarzbauer 1991). Diese Proteinviefalt wird durch alternatives *Splicing* der prä-mRNA oder Prozesse der posttranslationalen Modifikation wie Glykolisierung und Phosphorylierung erzeugt (Romberger 1997). Die Moleküldomänen ED-A (*type III homology extra domain A*), ED-B (*type III homology extra domain B*) und IIICS (*type III homology connectin segment*) unterliegen diesem Prozess des alternativen *Splicings* (Schwarzbauer 1991). Fn kommt zum einen in löslicher Form im Plasma (pFN), welche größtenteils durch Hepatozyten gebildet wird, vor. Zum anderen findet man zelluläres Fn (zFN) in der EZM, welches durch FBs, Epithelzellen und Makrophagen produziert wird (Romberger 1997). pFN und zFN unterscheiden sich im Vorhandensein der ED-A-

bzw. ED-B-Domäne, welche im pFN fehlen. Im zFN findet man eine variable Anzahl dieser Domänen (White et al. 2011). ED-A⁺-Fn und ED-B⁺-Fn sind „kassettenartige“ Exons, welche unabhängig voneinander während des alternativen *Splicings* in der prä-mRNA (*messenger-RNA*) belassen oder aus dieser entfernt werden können (Chauhan et al. 2004). Die Molekülvarianten ED-A⁺- und ED-B⁺-Fn kommen vor allem während der Embryonalentwicklung vor. Im gesunden adulten Gewebe können sie nahezu nicht nachgewiesen werden. Eine eindrucksvolle Reexpression findet jedoch während verschiedener physiologischer (Wundheilung) und pathologischer (Fibrose, Tumorwachstum) Gewebsumbauprozesse sowie während der Angiogenese statt (Carnemolla et al. 1989; French-Constant et al. 1989; Rybak et al. 2007). In einer Arbeit von Serini et al. konnte gezeigt werden, dass ED-A⁺-FN und TGF-β1 die Differenzierung von FBs zu ASMA-positiven MyoFBs induzieren, was die Bedeutung von ED-A⁺-Fn für pathologische Prozesse wie Atherosklerose, Lungenfibrose und Leberfibrose unterstreicht (Serini et al. 1998). Anhand der Lungenfibrose konnte gezeigt werden, dass zFN in den Regionen aktiver Fibrose vermehrt abgelagert wird und dies von einer vermehrten Expression von ASMA begleitet wird (Kuhn et al. 1991). Im Mausmodell ließ sich außerdem nachweisen, dass ED-A⁺- Mäuse keine Lungenfibrose entwickeln (Muro et al. 2008). Die Reexpression sonst nur in der Embryonalentwicklung vorkommenden Fns in Assoziation mit der proliferativen Aktivität und Gefäßneubildung während pathologischer Prozesse qualifiziert Fn möglicherweise als Marker für die zelluläre Aktivität während der Fibrose und Tumorangiogenese im Hinblick auf Prozesse wie Tumorprogression und Metastasierung (Kosmehl et al. 1996). Die Interaktion von Fn mit Zellen wird durch Integrine vermittelt. Integrin α5-β1 wird als „klassischer“ Fibronektinrezeptor bezeichnet, die Bindung der ED-A- Domäne wird jedoch durch die α4- Integrine, und den *toll-like-receptor 4* (TLR4) vermittelt (Hynes 2002; White et al. 2008).

2.3.5.2 Tenascin-C (Tn-C)

Tenascine beschreiben eine Familie hoch konservierter, großer oligomerer Glykoproteine der EZM von Vertebraten (Hsia et al. 2005). Das Vorhandensein von Tenascin wurde vor etwa 30 Jahren erstmalig in Gliomen, im Muskelgewebe und im Nervensystem beschrieben (Chiquet-Ehrismann et al. 1994; Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Tenascin wird außerdem in kritischen Phasen der Embryonalentwicklung und insbesondere der Organogenese des Herzens vermehrt exprimiert. Hier ist es von

entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Myokards und der Herzklappen (Imanaka-Yoshida et al. 2004; Imanaka-Yoshida et al. 2003). Beim Gesunden ist Tenascin in aller Regel nicht (Willems et al. 1996) oder nur in sehr kleinen Mengen in bestimmten Geweben wie z.B. in den Chordae tendinae der Papillarmuskel- und der Segelklappen (Sato et al. 2001) und am Ursprung der Klappensegel zu finden (Imanaka-Yoshida et al. 2003). Bisher konnten Tn- C, -X, -R und -Y als Isoformen innerhalb der Molekülfamilie beschrieben werden (Erickson 1993; Hagios et al. 1996). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in Länge und Struktur ihrer Einzelketten, ähneln sich jedoch strukturell in einem der Familie übergeordneten Strukturprinzips hinsichtlich der Anordnung der Moleküldomänen (Golledge et al. 2011). Eine exemplarische Darstellung des Tenascinmoleküls erfolgt in **Abbildung 2**.

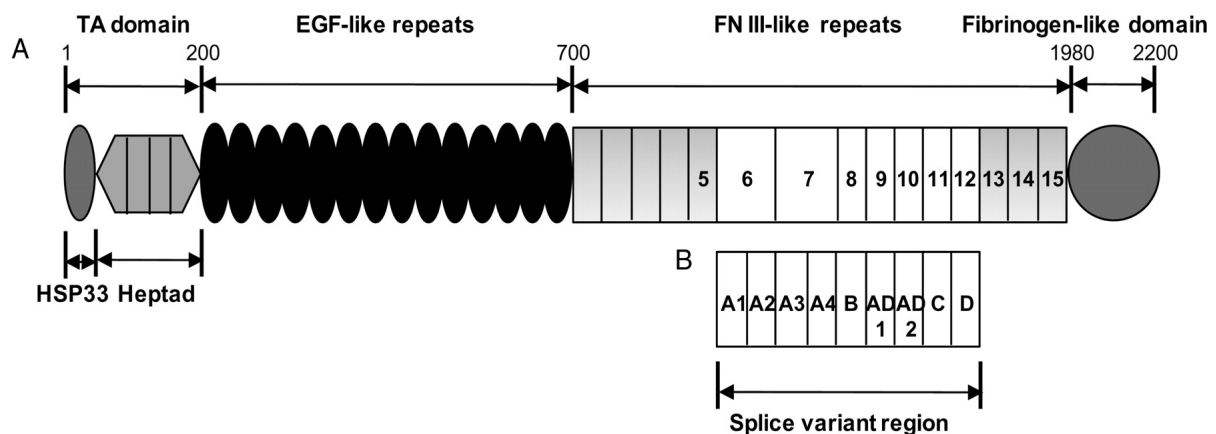


Abb.2 (A) Diese Abbildung stellt die Struktur einer Einzelkette des Tenascin-C Moleküls dar. (B) Aufgrund alternativen *Splicens* der prä-mRNA der *FN III-like repeats*, 6–12, existiert Tn-C in verschiedenen Isoformen mit variierender Funktion und Größe. (Golledge et al. 2011)

Alle Tenascinketten bestehen aus einer *assembly domain* am N-terminalen Ende, gefolgt von einer zwischen den Isoformen variierenden Zahl von *EGF- (Epidermal growth factor) like repeats* und *fibronectin type III like repeats* sowie am C-terminalen Ende einer globulären Domäne mit Strukturhomologie zu Fn, welche ebenfalls in ihrer Anzahl variieren kann. Jede dieser verschiedenen Domänen ist in der Lage, mit verschiedenen Bindungspartnern der EZM durch Bindung an verschiedene Oberflächenrezeptoren zu interagieren (Orend 2005). Im Hinblick auf diese Domänenorganisation stellt Tenascin ein außerordentlich pleiotropes Molekül dar mit der Fähigkeit, eine Fülle von Funktionen während physiologischer als auch pathologischer Prozesse des Gewebes wahrzunehmen.

Tn-C wird auch als Hexabrachion bezeichnet, weil es sich um ein Molekül, bestehend aus 6 Einzelketten, handelt, welche über Disulfidbrücken am N-terminalen

Ende miteinander verbunden sind. Das humane Tn-C-Molekül kommt in sowohl strukturell als auch funktionell unterschiedlichen Molekülvarianten vor, welche durch alternatives *Splicing* im Bereich der *Fibronektin-Typ-III repeats* generiert werden (Mighell et al. 1997). Gehäuft kommen die große, ungespleißte Isoform (Tenascin-C_L = large, 280 kDa) und die kleine, komplett gespleißte Isoform (Tenascin-C_S = small, 190 kDa) vor (Balza et al. 1993; Leprini et al. 1994; Siri et al. 1991). Weitere *Splicing*-Varianten mit Bedeutung für verschiedene pathologische Geweberemodellingprozesse u.a. während der Tumordinvasion und –progression konnten in den letzten Jahren beschrieben werden (Berndt et al. 2006). Aufgrund der außerordentlichen Molekülstruktur und der Fähigkeit zur Modulation seiner adhäsiven Eigenschaften ist Tn-C von besonderer Bedeutung für zelluläre Vorgänge wie Migration und Proliferation (Chiquet-Ehrismann et al. 1991). Tn-C_L und Tn-C_S werden während verschiedener pathologischer Prozesse unterschiedlich exprimiert (Borsi et al. 1992; Carnemolla et al. 1999). Während Tn-C_L vor allem in der EZM im Umbau befindlicher Gewebsstrukturen zu finden ist (Murphy-Ullrich et al. 1991; Tucker et al. 1994), kann Tn-C_S vor allem in der EZM reifen adulten Gewebes nachgewiesen werden (Chiquet-Ehrismann et al. 1991). Diese Besonderheit von Tn-C liegt in unterschiedlichen Eigenschaften, im Speziellen der Stabilität und Adhäsivität, begründet. So bindet Tn-C_S deutlich stabiler an Fn und erlangt in Adaption an die Ansprüche an reife Gewebsstrukturen eine stärkere Adhäsivität (Chung et al. 1995). Tn-C_L trägt durch seine antiadhäsiven Eigenschaften zur erforderlichen Flexibilität der im Umbau befindlichen Gewebe bei (Siri et al. 1995). Aufgrund dieser verschiedenen Eigenschaften von Tn-C können Prozesse der Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung verschiedenartig und teilweise auch gegensätzlich moduliert werden. Die Arbeitsgruppe um Imanaka-Yoshida konnte den kardialen interstitiellen FB als Hauptquelle für Tn-C, im Speziellen der großen, ungespleißten Isoform Tn-C_L, ausmachen (Imanaka-Yoshida et al. 2002). Tn-C ist ein bioaktives Molekül und dient der Regulation der Zellfunktion. Es induziert die Migration und Differenzierung kardialer MyoFBs und ist an der Vernetzung der KMs beteiligt. Durch seine antiadhäsiven Eigenschaften, ist es in der Lage, die Interaktion von Zellen mit Fn zu unterbrechen (Chiquet-Ehrismann et al. 1986) und eine *Downregulation* fokaler Adhäsionen zu bewirken (Murphy-Ullrich et al. 1991). KMs müssen während des kardialen *Remodellings* die Zellform und das Zytoskelett neu organisieren sowie neue räumliche Interaktionen mit dem Bindegewebe aufbauen. Möglicherweise

verändert bzw. reorganisiert Tn-C die Verbindungen der KMs zur Umgebung in der Umbauregion, um die KM dabei in ihrer Funktion zu unterstützen (Imanaka-Yoshida et al. 2004). Die Induktion der Tn-C-Expression wird durch eine Reihe von Faktoren vermittelt. Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen spielen oxidativer und mechanischer Stress eine wichtige Rolle (Chiquet et al. 2009; Tucker et al. 2009; Yamamoto et al. 1999). Eine Reexpression von Tn-C in Assoziation zum pathologischen Geweberemodelling konnte beim Erwachsenen während Prozessen der Wundheilung, bei Tumorerkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet werden (Chiquet-Ehrismann 2004). Die Höhe des Tn-C Spiegels scheint dabei ein verlässlicher Biomarker bezüglich einer Aussage zur Progression und Prognose zu sein, weshalb Tn-C durch die Arbeitsgruppe um Imanaka-Yoshida auch als Biomarker der Krankheitsaktivität vorgeschlagen wurde (Imanaka-Yoshida et al. 2004). Diese Annahme konnte am Beispiel des Myokardinfarktes durch Matsushita et al. ebenfalls belegt werden. Tn-C konnte an der Grenzzone zwischen Infarktregion und intaktem Myokard, welche dem Ort der aktivsten Umbauprozesse entspricht, lokalisiert werden (Matsushita et al. 1999). Trotz der Vielzahl an Studien zum Tn-C sind jedoch bis heute die genauen Mechanismen der Induktion und Inhibition der Reexpression noch nicht ausreichend geklärt.

2.3.5.3 Reexpression fetaler Molekülvarianten von Fn und Tn-C

2.3.5.3.1 Die Bedeutung von Fn und Tn-C für die Organogenese des Herzens

Fn wird während der Embryo- und Organogenese des Herzens vermehrt exprimiert, postnatal kommt es zu einem Expressionsverlust (Kim et al. 1999). Die außerordentliche Wichtigkeit von Fn für die Embryogenese konnte in einer Arbeit von George et al. überzeugend dargestellt werden. Im Tiermodell ließ sich zeigen, dass Fn-knockout-Mäuse aufgrund von schwerwiegenden embryonalen Entwicklungsstörungen verstarben (George et al. 1993). Mäuse, bei denen jedoch entweder ED-A⁺- oder ED-B⁺-Fn fehlte, durchliefen eine normale Entwicklung (Fukuda et al. 2002; Muro et al. 2003). Wenn aber gleichzeitig eine Deletion am ED-A⁺- und ED-B⁺-Fn-Exon stattfand, führte diese zu einer Letalität während der Embryogenese und zu schweren kardiovaskulären Defekten (Astrof et al. 2007). Fn scheint zudem essentiell für die Entwicklung des kardialen als auch systemischen Gefäßapparates zu sein (George et al. 1997). Pränatal, zum Zeitpunkt der

Vaskulogenese, kommt es zu einem transienten Expressionsanstieg von sowohl Fn-mRNA als auch dem Fibronectinprotein (Corda et al. 2000). Der Einfluss von Fn auf die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung sowie die räumlich-zeitlich unterschiedliche Expression von Fn und dessen *Splicing*varianten während der Embryo- und Organogenese verleihen dem Glykoprotein, im Speziellen den Isoformen ED-A⁺- und ED-B⁺-Fibronectin, die Eigenschaft eines Markers für einen immaturren Phänotyp aller kardialen Zellen (Corda et al. 2000).

Die Expression von Tn-C verläuft während der Gewebsumbauprozesse in der Embryogenese, der Wundheilung, der Karzinogenese sowie im Rahmen regenerativer Vorgänge nach einem spezifischen räumlich-zeitlichen Muster. Tn-C wird von präkardialen mesodermalen Zellen gebildet, während diese sich zu KMs differenzieren. Dieses Phänomen ist rückläufig, sobald die Differenzierung abgeschlossen ist. In einer späteren Phase der Herzentwicklung, während mesenchymale Zellen des proepikardialen Organs zum Herzen wandern, kommt es erneut zur Expression von Tn-C. Sobald dieser Prozess jedoch abgeschlossen ist, kommt es interessanterweise zur Herunterregulation der Expression von Tn-C (Imanaka-Yoshida et al. 2003). Trotz der implizierten Bedeutung von Tn-C für die Embryogenese konnte am *knock-out*-Maus-Modell für Tn-C gezeigt werden, dass diese im Gegensatz zu Fn (siehe oben) ohne Fehlbildungen heranwachsen (Saga et al. 1992).

2.3.5.3.2 Die Bedeutung von Fn und Tn-C während des physiologischen und pathologischen kardialen Geweberemodellings

Die Expression von ED-A⁺- und ED-B⁺-Fn während verschiedener pathologischer Vorgänge und die Tatsache, dass diese bis zu 40% des Fns während der embryonalen Entwicklung ausmachen, unterstreicht die Annahme, dass diese Fn-Isoformen die Zellproliferation als auch -migration unterstützen. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass ED-A⁺- als auch ED-B⁺-Fn während kardialer Nekrose und Fibrose reexprimiert werden (Samuel et al. 1991; Ulrich et al. 1997). Fn geht dabei der Akkumulation von Kollagen voraus und scheint ein sensiblerer Marker für pathologische Vorgänge am Herzen als Kollagen zu sein (Contard et al. 1991). Eine Reexpression von Fn und Tn-C im Gewebe von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und valvulärer Kardiomyopathie (VCM) bzw. ihrer Kombination konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit

beschrieben werden. Die Reexpression korrelierte mit dem Grad der histologischen Gewebeschädigung. Ebenfalls korrelierte in diesen Studien die Reexpression von Tn-C und Fn im rechten Vorhof mit der im linksventrikulären Septum, welche das rechte Vorhof ableitend aus diesen Ergebnissen als Reflektor des Expressionsstatus der EZM-Komponenten im linken Ventrikel qualifizieren könnte (Baldinger et al. 2011; Franz et al. 2010a). Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe am Tiermodell der chronischen Abstoßungsreaktion nach HTx zeigen, dass eine vermehrte Expression von Tn-C im Gewebe mit der Abstoßungsreaktion nach HTx assoziiert ist (Franz et al. 2010b; Franz et al. 2011b). Die Arbeitsgruppe um Booth untersuchte die chronische Abstoßungsreaktion nach HTx bei ED-A⁺-Fn-*knock-out*-Mäusen. Sie konnte die essentielle Bedeutung von ED-A⁺-Fn für die Fibroseentwicklung und damit für die chronische Abstoßungsreaktion zeigen (Booth et al. 2012). Diese Studien zeigen, dass eine Reexpression von Fn-Varianten während verschiedener pathologischer Prozesse am Herzen auftritt und mit dem Grad der Gewebeschädigung im Sinne der Fibroseentwicklung korreliert. Eine solche Reexpression tritt am gesunden Herzen nicht auf, weshalb sich Fn-Varianten als Marker für pathologische kardiale Prozesse zu eignen scheinen (Gabler et al. 1996; Heling et al. 2000; Oliviero et al. 2000), im Falle der chronischen Abstoßungsreaktion nach HTx als Marker der drohenden Abstoßungsreaktion mit ihren klinischen und prognostischen Folgen (Franz et al. 2012). Fetale Fn-Varianten scheinen sich zudem auch als therapeutisches Target zum einen für die funktionelle Blockade zur Verminderung der Fibrosebildung, und zum anderen zum antikörpervermittelten Transfer von Medikamenten direkt in die betroffene Region bzw. zur antikörpervermittelten Detektion dieser zu eignen (Franz et al. 2012). Um die mit dem Fn-Molekül verbundenen therapeutischen als auch diagnostischen Möglichkeiten zukünftig besser nutzen zu können, scheint es von außerordentlicher Wichtigkeit zu sein, dessen Eigenschaften und Verhalten während kardialer *Remodelling*prozesse weiter zu erforschen. Verschiedene Studien belegen eine Reexpression von Tn-C während entzündlicher Prozesse sowie Fibrosierung während der dermalen Wundheilung (Midwood et al. 2009). Eine frühe und vorübergehende Reexpression von Tn-C, welche rückläufig ist, sobald sich eine Kollagennarbe gebildet hat, tritt bei dermalen als auch kardialen *Remodelling*prozessen auf. Im Speziellen tritt eine Reexpression von Tn-C in hohem Maße bei Herzerkrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt, der Myokarditis, der DCM, der arteriellen Hypertonie und allgemein

im Endstadium einer Herzinsuffizienz auf. Es gibt Hinweise darauf, dass Tn-C während des pathologischen kardialen Geweberemodellings die Migration, Differenzierung und Kontraktion von MyoFBs nach Myokardverletzung beeinflusst (Tamaoki et al. 2005). In verschiedenen Studien konnte dargestellt werden, dass die Tn-C-Expression zum einen mit der Aktivität der Erkrankung, und zum anderen mit einer schlechteren Prognose und Mortalität korrelieren. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Tn-C-Spiegel und der Entzündungsaktivität bzw. dem Grad der histologischen Schädigung konnte eine Studie der Arbeitsgruppe um Morimoto bei Patienten mit Myokarditis in sequentiellen Biopsieentnahmen darstellen (Morimoto et al. 2005). Ebenfalls für das Krankheitsbild der Myokarditis konnte zum einen die Arbeitsgruppe um Imanaka-Yoshida eine Korrelation der Tn-C-Expression mit der Entzündungsaktivität zeigen, woraufhin Tn-C von den Autoren als Biomarker der Krankheitsaktivität bezeichnet wurde (Imanaka-Yoshida et al. 2002). Zum anderen wurde Tn-C in einer weiteren Studie als prädiktiver Marker für Inflammation bei Patienten mit einer Myokarditis benannt (Tsukada et al. 2009). Studien bei DCM-Patienten konnten einen Zusammenhang zwischen Serum-Tn-Spiegel und Schwere der Herzinsuffizienz, dem Ausmaß des kardialen *Remodellings* sowie der linksventrikulären Funktionsstörung zeigen. Die Arbeitsgruppe um Aso konnte an DCM-Patienten signifikant höhere Serumspiegel von Tn-C im Vergleich zu gesunden Kontrollen und eine signifikante Korrelation zum NYHA-Stadium, der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), des linksventrikulären endsystolischen Diameters (LVESD) sowie dem BNP-Spiegel zeigen (Aso et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte an DCM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls eine Korrelation von Serum-Tn-C-Spiegel und NYHA-Stadium, BNP-Spiegel, dem linksventrikulärem enddiastolischen Diameter (LVEDD) sowie der LVEF gezeigt werden (Terasaki et al. 2007). Die kombinierte Betrachtung von Tn-C und BNP im Serum von DCM-Patienten ermöglicht eine Voraussage über das Auftreten einer kardialen Dekompensation bzw. Versterben des Patienten (Fujimoto et al. 2009). Weiterhin untersuchte eine Studie von Milting et al. die Aussagekraft von verschiedenen EZM-Komponenten, darunter auch TIMP-1 und Tn-C im Serum, als mögliche Biomarker für das myokardiale *Remodelling*. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass u.a. Tn-C und TIMP-1 bei Patienten im Endstadium einer Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht waren (Milting et al. 2008). Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Expression von Tn-C kurz im Zuge

pathologischer Prozesse am Herzen auftritt und während des Geweberemodellings eine Expressionspersistenz vorliegt. Im gesunden adulten Herzwert ist Tn-C nicht vorhanden bzw. erfolgt - im Falle einer Restitution - nach Ablauf dieser pathologischen Prozesse eine *Downregulation* der Expression. Tn-C wird jedoch sowohl im Serum als auch im Gewebe von Patienten mit einer chronischen Herzerkrankung gefunden. Aus diesem Grund könnte Tn-C für die Diagnostik und Therapie von Herzerkrankungen im Besonderen der DCM in Zukunft von besonderer Bedeutung sein. Studien zur kardialen Resynchronisationstherapie (CRT) oder Behandlung mit Eplerenon weisen darauf hin, dass Behandlungen, die sich positiv auf das kardiale *Remodelling* auswirken, gleichzeitig den Tn-C-Spiegel senken (Hessel et al. 2007; Nishioka et al. 2007). Daraus ließe sich die Annahme ableiten, dass Tn-C außerdem zur Überwachung von Reparaturprozessen des kardialen Gewebes und der Herzfunktion verwendet werden könnte.

3. Motivation und Zielstellung der Arbeit

Seit über 30 Jahren beschäftigen sich die WHO und verschiedene Fachgesellschaften mit der Definition der Kardiomyopathie und im Besonderen der DCM. Dank des medizinischen Fortschritts und durch genauere diagnostische Möglichkeiten konnten Abgrenzungen zu anderen Formen der Kardiomyopathie geschaffen, die Pathophysiologie und Anatomie untersucht sowie die Ätiologie der DCM beleuchtet werden. Damit erlangten Kliniker partiell eine höhere medizinische Sicherheit, andererseits aber auch Unsicherheit in der Diagnosestellung der DCM. Das Paradoxon erklärt sich durch vielfältige Überschneidungen der Krankheitsbilder im Sinne der primären und sekundären DCM. Außerdem fehlen sichere diagnostische Marker, die den Krankheitszustand des Herzwes frühzeitig zum Biopsiezeitpunkt und hinsichtlich der Prognose der Erkrankung genau beschreiben. Bisherige diagnostische Möglichkeiten im Rahmen der EMB, nämlich die histopathologische Beurteilung der Fibrose und der Inflammation sowie der Nachweis von Virusgenom wurden in den letzten Jahren zunehmend kritisch diskutiert. Oftmals wird eine DCM bzw. der ablaufende pathologische Prozess im Herzwes erst dann erkannt, wenn die linksventrikuläre Funktion bereits eingeschränkt ist und die Patienten an den Symptomen einer ernsthaften Herzinsuffizienz leiden. So repräsentieren die linksventrikuläre Ejektionsfraktion oder die Beurteilung der Herzfunktion durch das NYHA-Stadium zwar klinisch wertvolle Parameter zur Beurteilung des Verlaufes und der Prognose der Erkrankung, werden aber meist erst dann erhoben, wenn bereits ein beträchtlicher Teil des kardialen Gewebes geschädigt wurde. Durch die Einführung von beta-Blockern und ACE-Hemmern konnte die Prognose der Patienten schließlich verbessert werden. Das Herzversagen bleibt jedoch eine bisher sicher voraussagbare, aber hinsichtlich des zeitlichen Auftretens nicht abschätzbare Folge der Erkrankung. Deshalb ist es von außerordentlicher Bedeutung, einen Weg zu finden, die Erkrankung so frühzeitig wie möglich zu diagnostizieren und Prognosemarker zu identifizieren, die eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung und damit über deren Schwere treffen können. Auf dieser Basis sollte es möglich sein, potentiell notwendige diagnostische Interventionen und therapeutische Maßnahmen zu planen, die den Krankheitsverlauf abmildern und eventuell sogar aufheben können. Dieses Bestreben hat nicht nur individuell-persönlichen Nutzen für den Betroffenen, sondern verfolgt auch sozio-

ökonomische Aspekte, da die Herzinsuffizienz derzeit in Deutschland der häufigste Grund für Krankenhausaufenthalte ist (Neumann et al. 2009). Diese Überlegungen betreffen im Besonderen die idiopathischen Formen der DCM, da es für diese Krankheitsgruppe nicht möglich ist, eine zu Grunde liegende Ursache zu behandeln. In der RALES - Studie konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch die Arbeitsgruppe um Zannad et al. ein Zusammenhang zwischen der Beeinflussung der *Remodelling*prozesse der EZM durch Spironolacton und der linksventrikulären Dysfunktion und schließlich dem Überleben der Patienten hergestellt werden (Zannad et al. 2000). Diese Studie zeigt eindrücklich, dass die Prozesse der kardialen EZM und die daran beteiligten Komponenten von wesentlicher Bedeutung für den Krankheitsverlauf der Herzinsuffizienz sind. Die EZM ist in ihrer Bedeutung für das kardiale *Remodelling* zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen als auch klinischen Interesses gerückt, da sie bedeutende Aufgaben hinsichtlich der mechanischen, elektrischen und chemischen Signalübertragung während der Embryonalentwicklung sowie während pathologischer und physiologischer kardialer Prozesse wahrnimmt. Bestandteile der EZM können eine agonistische oder antagonistische Rolle im Krankheitsverlauf hin zur Abheilung des kardialen Gewebes oder hin zur Herzinsuffizienz nach Gewebeschädigung spielen (Bowers et al. 2010). Nach unserem besten Wissen existiert aktuell keine Studie, welche die kardiale EZM während des kardialen Geweberemodellings im Hinblick auf die prognostische Bedeutung der EZM-Komponenten MMP-9, TIMP-1 sowie fetalen Fn- und Tn-C-Varianten als mögliche Biomarker im Serum oder Herzgewebe von Patienten mit dem Erkrankungsbild einer DCM untersucht hat. Es gibt zwar Studien an DCM-Patienten, die kurz vor einer HTx stehen, also an einer schweren Form der Herzinsuffizienz leiden und Studien, die sich auf einzelne der von uns untersuchten möglichen Biomarker konzentrieren. Aber es existieren keine Studien, die die Rolle der EZM bzw. ihrer Komponenten in diesem Umfang zusammenhängend bei Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und ihre Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung untersucht haben. Anknüpfend an wegweisende Studien zur Rolle einzelner EZM-Komponenten für das kardiale *Remodelling* bei Patienten mit DCM, KHK, Myokardinfarkt, Myokarditis und chronischer Abstoßungsreaktion nach HTx haben wir in dieser hier vorliegenden Arbeit bei Patienten mit dem Bild einer chronischen Herzinsuffizienz im Rahmen einer DCM die Serumspiegel von MMP-9, TIMP-1 und B⁺ Tn-C sowie die Gewebeexpression von ED-A⁺- Fn, B⁺ Tn-C und die

Expression ASMA- positiver Zellen qualitativ als auch quantitativ analysiert und deren Bedeutung für das Überleben des Patienten untersucht.

Zur Umsetzung dieser Ziele sollen im Einzelnen folgende Teilaspekte bearbeitet werden:

Prospektive Analyse der klinischen, laborchemischen und apparativen Untersuchungsdaten aller Patienten, die sich im Zeitraum vom 1997 bis 2008 in der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena einer EMB unterzogen haben und Selektion des Anteils von Patienten mit der Diagnose einer DCM

Bestimmung der Serumkonzentrationen von MMP-9, TIMP-1 und B⁺ Tn-C bei diesen Patienten mittels ELISA-Technologie

Analyse der Proteinexpression und Gewebeverteilung von ED-A⁺- Fn, B⁺ Tn-C und ASMA-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenztechnik

Quantitative Analyse der Proteindepositionslevel mittels konfokaler *laser-scanning*- Mikroskopie

Korrelative Analyse der Serumkonzentrationen, respektive Gewebeproteindepositionslevel aller untersuchten EZM-Marker zu klinischen und prognostischen Daten des definierten Patientenkollektivs

4. Material und Methoden

4.1 Patienten

Im Zeitraum zwischen 1997 und 2008 unterzogen sich in der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena 459 Patienten mit dem Bild einer linksventrikulären Dysfunktion einer EMB, nachdem eine koronare Herzkrankheit in der Koronarangiographie ausgeschlossen worden war. 326 dieser Patienten mit der auch histologisch gesicherten Diagnose einer DCM wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Patienten mit einer akuten, *borderline* oder persistierenden Myokarditis sowie Patienten mit einer kardialen Beteiligung im Rahmen einer Systemerkrankung, Kanalopathien, Amyloidose, arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie (ARVD), restriktiven Kardiomyopathien sowie Speichererkrankungen wurden ausgeschlossen. Zum Zeitpunkt der EMB wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung, die die Durchführung einer Koronarangiographie, einer EMB sowie von Blutentnahmen einschloss, ab. Die Patienten wurden in Abständen von 3 bis 6 Monaten nach EMB in die Herzinsuffizienz-Ambulanz des Universitätsklinikums Jena zu einer Kontrolluntersuchung einbestellt. Hierbei wurden neben dem klinischen Zustand des Patienten die Ejektionsfraktion sowie die linksventrikulären Diameter echokardiographisch beurteilt. Waren die Patienten in der Kontrolle eines niedergelassenen Kardiologen, so wurden diese gebeten, uns die Ergebnisse der echokardiographischen Kontrolluntersuchung zukommen zu lassen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (3098-04/11). Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes und Body-Mass-Index (BMI) sowie die aktuelle Medikation der Patienten wurden erhoben, da eine Einflussnahme auf den Prozess des kardialen *Remodellings* nicht ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin wurde die klinisch-symptomatische Einteilung nach NYHA-Stadien erhoben. Eine Charakterisierung aller in die Studie eingeschlossenen Patienten findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1 Patientencharakteristika

Charakteristik	Wert	n*
Alter (y)	48.7 ± 11.9	326
Geschlecht (männlich/weiblich)	263/63	326
BMI (kg/m ²)	27.4 ± 4.9	301
NYHA -Stadium		295
I	35 (11.9)	
II	110 (37.3)	
III	122 (41.4)	
IV	28 (9.5)	
NYHA Stadium I/II vs. III/IV	145/150	295
Symptombdauer vor EMB (Tage)	99.3 ± 206.9	212
Bluthochdruck	69 (27.8)	248
Diabetes	42 (16.8)	250
Echokardiographie :		
EF (%)	31.2 ± 12.0	326
LVEDD (mm)	64.6 ± 8.7	311
Medikation :		
ACE/ARB	275 (92)	299-
beta-Blocker, ,	263 (88)	299
Aldost-Antagonist	106 (35)	299
Ca-Antagonist	29 (10)	299
Diuretikum	242 (81)	299
Glykosid	113 (38)	299

Tab.1 Patientencharakteristika: Die Werte sind in n (%) oder als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.* Die Anzahl der Patienten, für die eine korrespondierende Variable identifiziert wurde. BMI = body mass index; EMB = Endomyokardbiopsie; EF= Ejektionsfraktion; LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; BNP= *brain natriuretic peptide*; ACE =*angiotensin-converting-enzyme*; ARB =Angiotensin Rezeptorblocker; Aldost-Antag =Aldosteronantagonist, Ca-Antagonist =Calcium-Antagonist;

4.2. Endomyokardbiopsie, Echokardiographie und Laborparameter

Nach Abschluss der Koronardiagnostik wurde die standardmäßig verwendete 5-French-Schleuse, die in der Regel in der rechten Arteria femoralis platziert war, über einen Draht auf eine 7-French-Biopsieschleuse der Firma Cordis (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) oder Signus (Signus, Alzenau, Deutschland) gewechselt. Durch diese Schleuse wurde die Biopsiezange eingeführt, mit deren Hilfe 6 Biopsien aus der linksventrikulären freien Wand entnommen wurden. Die Gewebeschnitte wurden entweder in Formalin fixiert und in Paraffin für histologische Auswertungen eingebettet oder für Immunfluoreszenzmarkierungen in flüssigem Stickstoff bei -80°C schockgefroren. Die Ergebnisse der Echokardiographie, im Besonderen die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) wurden während routinemäßig vorgenommener echokardiographischer Untersuchungen durch von der Studie unabhängige, erfahrene Kardiologen erhoben. BNP wurde gemäß interner und internationaler Standards gemessen.

Die histologischen als auch immunhistologischen Untersuchungen zur histopathologischen Bewertung der Biopsie wurden durch Prof. Dr. Gerhard Mall am Institut für Pathologie des Klinikums Darmstadt, Deutschland, durchgeführt. Die immunhistochemische Beurteilung erfolgte hinsichtlich infiltrierender T-Zellen und Makrophagen. Die 4µm dünnen Biopsieschnitte wurden zunächst in Aceton fixiert. Es wurden primäre Antikörper zur Detektion der gesamten T-Lymphozyten (CD3, *clone* SP7, Neomarkers, Fremont, CA, USA), der CD4- und CD8- Lymphozyten-Subpopulationen (CD4: *clone* MT310, DAKO; CD8: *clone* C8/144B, Marque, Rocklin, CA, USA) sowie der Makrophagen (CD 68, *clone* KP1, DAKO, Glostrup, Denmark) verwendet. Es wurden die Größe der Myozyten sowie der prozentuale Anteil der Fibrose beurteilt. Darüber hinaus wurde die Anzahl der infiltrierenden Zellen pro Quadratmillimeter bestimmt. Die Expression von Peptiden des *Major Histocompatibility II-Complex* (MHC II) (oder Human-Leukozyten-Antigen DR (HLA DR)) – wurde ebenso mit Hilfe von Antikörpern (*clone* CR3/43, DAKO) nachgewiesen (HLA DR \mapsto -Kette). Die Intensität der Färbung wurde semiquantitativ nach einer zuvor festgelegten Einteilung bestimmt (0 = fehlende oder schwache Anfärbung auf EndZs oder interstitiellen Zellen, 1+ = fokale Färbung von EndZs oder interstitiellen Zellen, 2+ = multifokale Anfärbung beschränkt auf interstitielle Zellen, 3+ = diffuse Anfärbung endothelialer Zellen sowie fokale Anfärbung von Myozyten, 4+ = diffuse

Anfärbung von Myozyten und EndZs). Entsprechend dieser Anfärbung wurden die Patienten in Gruppen eingeteilt: Anfärbungsintensität 0 = *none*; Anfärbungsintensität 1 = *mild*; Anfärbungsintensität 2 = *moderate*; Anfärbungsintensität 3 und 4 = *severe*. Weiterhin wurde der Nachweis viralen Genoms aus den Gewebeschnitten der EMB durchgeführt. Die Analysen erfolgten am Institut für Virologie der Universitätsklinik Jena und betrafen den Nachweis von Adenovirus- und Parvovirus B19- DNA und enteroviraler RNA (Kuethe et al. 2006). Anhand dieser histologischen als auch immunhistologischen Analysen konnte eine Einordnung des Krankheitsbildes hinsichtlich DCM, Myokarditis und inflammatorischer Kardiomyopathie erfolgen sowie andere Krankheitsbilder entsprechend unseres Untersuchungsschwerpunktes ausgeschlossen werden.

4.3 Bestimmung von MMP-9, TIMP-1 und B⁺ Tn-C im Serum

Innerhalb von 30 min nach Blutentnahme erfolgte eine Zentrifugation bei 2383 g für 25 min. Der Überstand wurde aliquotiert bei -80°C für spätere Analysen aufbewahrt. Die Serumkonzentration von MMP-9 wurden mittels des *Quantikine® Human MMP-9 (total) Immunoassay* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Sensitivität: 0.156 ng/mL; Intra- und Interassaypräzision (Variationskoeffizient) waren ≤3 und ≤8%) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Vor der Analyse wurde das Serum mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Serumkonzentration von TIMP-1 wurde mittels *Quantikine® Human TIMP-1 Immunoassay* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Sensitivität: 0.08 ng/mL; Intra- und Interassaypräzision (Variationskoeffizient) waren bei ≤5 und ≤4.9%) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Vor der Analyse wurde das Serum mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Serumkonzentration von B⁺ Tn-C wurden durch ELISA mittels *Tenascin-C Large (FN III-B) ELISA kit* (IBL, Hamburg, Germany; Sensitivität: 44 pg/mL; Intra- und Interassaypräzision (Variationskoeffizient) waren bei ≤10 und ≤9.4%) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Vor der Analyse wurde das Serum mit PBS im Verhältnis 1:8 verdünnt. Die Absorption bei 450 nm wurde durch das ELISA-Plattenlesegerät LAMBDA KC4 Reader (MWG-BIOTECH AG) gemessen. Die Serumproteinkonzentrationen wurden anhand von Standardkurven berechnet. Die Methode wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe in einer Untersuchung der Serumkonzentrationen der genannten Marker bei Patienten mit konzentrischer versus exzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie beschrieben (Franz et al. 2009).

4.4 Immunfluoreszenzmarkierungen von ED-A⁺-Fn, B⁺ Tn-C und ASMA-positiven Zellen im Gewebe

4.4.1 Immunfluoreszenzmarkierung von ED-A⁺-Fn

Für den Nachweis von ED-A⁺-Fn wurde der biotinylierte humane rekombinante SIP (*small immunoprotein*)-Format Antikörper F8, welcher mit Hilfe der Phagen-Display-Methode hergestellt wurde, verwendet (Borsi et al. 2003; Villa et al. 2008). Dieser Antikörper (AK) wurde mit sulfo NHS-LC-biotin Reagenz (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) biotinyliert. Ungebundenes Biotin wurde daraufhin separiert (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Das biotinylierte AK-Konstrukt wurde uns freundlicherweise von unserem Kooperationspartner, Herrn Prof. Dr. Dario Neri, Institut für pharmazeutische Wissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (ETHZ), zur Verfügung gestellt. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden zuvor schockgefrorene Gewebeproben verwendet. Die 4µm dicken Kryostat-Gewebeschnitte wurden zunächst für 10min in Acteon (-20°C) fixiert. Unspezifische Markierungen durch endogenes Biotin wurden unter Verwendung des DAKO *Biotin Blocking System* (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) inhibiert. Eine Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte mittels Peroxidase-Blockierungs-Lösung (PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 1000 ml Aqua dest.) + 1-3% H₂O₂). Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten SIP-F8 AK in einer Verdünnung von 1:300 (50µl pro Schnitt) für 60min bei Raumtemperatur. Daran schloss sich die Detektion des AK mit Hilfe des Tyramid-Signal-Amplifikationssystems TSATM Kit#22 mit HRP-Streptavidin und Alexa Fluor® 488 tyramide (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) entsprechend den Herstellerangaben an. Die Präparate wurden anschließend mit Vectashield (H-1000)/Vectashield DAPI (H-1200) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte durch Immunfluoreszenzanalyse mittels *confocal laser-scanning microscopy* (cLSM) unter Verwendung des Mikroskopes LSM 510 (Zeiss, Germany), wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben (Berndt et al. 2001; Franz et al. 2007).

4.4.2 Immunfluoreszenzmarkierung von B⁺ Tn-C

Die Immunfluoreszenzmarkierung von B⁺Tn-C erfolgte unter Verwendung eines monoklonalen Mausantikörpers (4C8MS IBL, Hamburg, Germany). Hierbei handelt es sich um denselben AK, mit dem auch die Detektion im Serum (ELISA) erfolgte.

Vor der Zugabe zum Gewebe wurde dieser mittels *Animal research Kit* (ARK, Dako, Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) gemäß den Angaben des Herstellers biotinyliert. Es erfolgte dann die Inkubation des Gewebes mit dem biotinylierten AK in einer Verdünnung von 1:20 (50µl pro Schnitt) für 60min bei Raumtemperatur. Der AK wurde durch Zugabe von Streptavidin-FITC (FITC = *Xuorescein isothiocyanate, green Xuorescence*, Dako Deutschland GmbH, Verdünnung 1:200) detektiert. In einigen Fällen wurde eine Doppelmarkierung mit CD31 zum Nachweis von Endothelzellen und damit von Gefäßstrukturen vorgenommen. Dazu wurde der monoklonale, *mouse-anti-human* CD31 Antikörper JC70A (Dako, Germany) verwendet und dem Gewebe in einer Verdünnung von 1:30 (50µl pro Schnitt) zugegeben. Die Detektion erfolgte schließlich durch Verwendung des Cy3-konjugierten *goat-anti-mouse* Sekundärantikörpers (Dianova GmbH, Hamburg, Germany, Verdünnung 1:200). Eindecken und Analyse der Präparate erfolgte wie bereits beschrieben.

4.4.3 Immunfluoreszenzmarkierung von ASMA-positiven Zellen

Die 4µm dicken Kryostat-Gewebeschnitte wurden zunächst für 10min in Acteon (-20°C) fixiert. Daraufhin erfolgte ein 5minütiger Spülvorgang mit TBS-Tween (*Tris buffered Saline* (2,25g *Tris* HCl, 17,125g *Tris*-Base, 21,95g NaCl, 2,5l *Aqua dest.*, 2,5ml *Tween*)). Der Primärantikörper zur Detektion von ASMA (*monoclonal mouse- \rightarrow human-Antibody*, clone: 1A4, M0851, DAKO, Deutschland) wurde in einer Verdünnung von 1:20 (*antibody diluent solution*, DAKO, Deutschland); 50µl pro Schnitt; zugegeben und für 60min bei Raumtemperatur in einer Dunkelfeuchtkammer inkubiert. Nach einem 5minütigen Spülvorgang mit TBS-Tween erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (*Goat-anti-mouse-Cy3*, Jackson Immuno Research, Dianova, 115-165-068), in einer Verdünnung von 1:200 (50µl pro Schnitt). Es folgte eine 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur in der Dunkelfeuchtkammer. Nach einem 5minütigen Spülvorgang mit TBS-Tween wurden die Präparate wie beschrieben eingedeckt und analysiert.

4.5 Qualitative und quantitative Analyse der Deposition von ED-A⁺-Fn, B⁺Tn-C und ASMA im Gewebe mittels Immunfluoreszenzanalyse

Zur Quantifizierung der Proteindeposition von ED-A⁺-Fn, B⁺Tn-C und ASMA in den Gewebeproben der EMB wurde die LSM 510 Software Rel. 3.2 (Zeiss) verwendet. In jedem Präparat wurden drei repräsentative, sich nicht überlappende Regionen der Biopsie ausgewählt. Jede wurde nach standardisierten Bedingungen am Mikroskop fotografiert: Objektiv-Linsen-Typ: ZEISS, Plan-APOCHROMAT 20x/0.75 Objektiv; optische Stärke: 1.2 μm ; *bit*-Stärke der generierten Bilder: 8-bit; Größe der gemessenen Region: 460.70 μm x 460.70 μm . Auf der Grundlage softwarebasierter Analysen wurde die Anzahl grüner Pixel pro Bild erfasst. Die angefärbte Region wurde in Prozent im Verhältnis zur gesamten Fläche des aufgenommenen Gesichtsfeldes errechnet. Aus den drei Aufnahmen pro Biopsie und Fall wurden Mittelwerte errechnet, welche die Menge der Proteindeposition bzw. den Anteil von MyoFBs und/oder VSMCs im Gewebe repräsentieren. Ein Beispiel zur Darstellung der Quantifizierungsmethode findet sich in **Abbildung 3**.

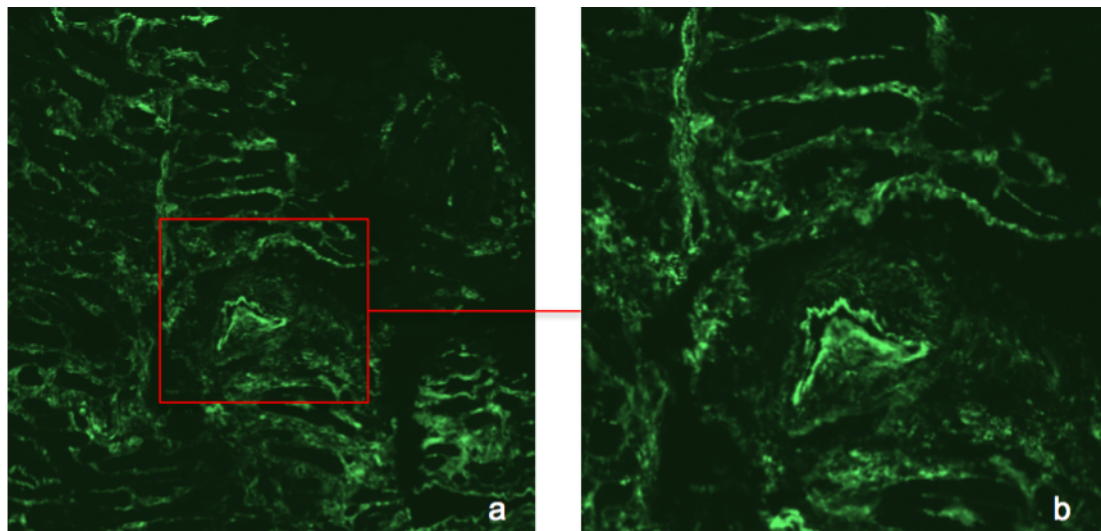


Abb. 3 a) Präparatbeispiel einer Immunfluoreszenzmarkierung zum Nachweis von ED-A⁺-Fn (grün), 10fache Vergrößerung b) Darstellung einer der drei ausgewählten Regionen anhand derer die Auswertung erfolgte, Vergrößerung: 20-fach

4.6 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung oder relative Häufigkeiten in Prozent angegeben. Wir führten eine *Cox-proportional-hazards* Regressionsanalyse durch, um eine Assoziation klinischer, hämodynamischer,

laborchemischer und histopathologischer sowie immunhistochemischer Variablen im Hinblick auf den kombinierten Endpunkt aus Tod und HTx zu untersuchen. Zunächst wurde ein univariates *Screening* durchgeführt. In der sich anschließenden multivariaten Analyse wurden dann statistisch signifikante Parameter mit einem p-Wert < 0.1 aus der univariaten Analyse sowie nach klinischen Erwägungen notwendige Variablen eingeschlossen. Überlebensanalysen der Patientengruppen wurden mittels Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt und mit Hilfe der *Log-rank*-Analyse verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden, um sie einer Kaplan-Meier-Analyse unterziehen zu können, in nominale Daten überführt, die eine Dichotomisierung der Daten erlauben. Für die Parameter TIMP-1, MMP-9 und B⁺-Tn-C aus dem Serum sowie B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn und ASMA-positiven Zellen im Gewebe wurden Grenzwerte unter Verwendung der *Log-rank*-Analyse definiert. Eine Darstellung der Grenzwerte findet sich in **Tabelle 2**.

Tabelle 2 Grenzwerte

Parameter	Grenzwert
TIMP-1 im Serum	149,9 ng/ml
MMP-9 im Serum	238,9 ng/ml
B ⁺ Tn-C im Serum	1208,7 ng/ml
B ⁺ Tn-C im Gewebe	4,97 %
ED-A ⁺ - Fn im Gewebe	2,10 %
ASMA-positive Zellen im Gewebe	2,17 %

Tab. 2 Mit Hilfe der *Log-rank*-Analyse ermittelte Grenzwerte. Die Angabe der Grenzwerte für die Gewebeparameter der EMB für B⁺ Tn-C, ED-A⁺- Fn und ASMA-positiven Zellen wurden in Flächenprozent (%) angegeben. In die Cox-Analysen gingen die genannten Werte als positiv oder negativ ein, wenn sie über oder unter dem Grenzwert lagen.

Für die LVEF wurde die Dichotomisierung unter Verwendung des Medians durchgeführt. Für die Inflammation wurden die Messwerte für T-Zellen und Makrophagen gemäß der Definition einer inflammatorischen Kardiomyopathie (d.h. nach der WHO/ISFC- Definition mehr als 14 entzündliche Zellen als Summe von Lymphozyten und Makrophagen pro Quadratmillimeter Myokard, (Richardson et al. 1996)) dichotomisiert. Basierend auf dem p-Wert wurde ein statistisch signifikantes Ergebnis bei einem p-Wert kleiner 0.05, ein statistisch hochsignifikantes Ergebnis bei einem p-Wert kleiner 0.005 und ein statistisch höchstsignifikantes Ergebnis bei einem p-Wert kleiner 0.0005 angenommen (Deenadayalan et al. 2010). Für die statistische

Analyse wurde die statistische Software JMP (Version 8.01, SAS Institute Inc., USA) verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

In unsere Studie konnten 326 Patienten mit einer DCM eingeschlossen werden. In unserem Patientenkollektiv befanden sich 263 Männer und 63 Frauen. Das Alter der Patienten betrug 49 ± 12 Jahre. Die Krankheitssymptome bestanden bei allen Patienten mindestens 100 Tage vor EMB bzw. Diagnosestellung. 80% der Patienten befanden sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses im NYHA-Stadium II bzw. III. Kardiovaskuläre Risikofaktoren boten etwa 30% der Patienten in Form von Bluthochdruck und etwa 20% in Form von Diabetes. Als Mittelwert zeigte die Echokardiographie eine EF von 31.2 ± 12.0 % und einen LVEDD von 64.6 ± 8.7 mm. Als Begleitmedikation erhielt ein Großteil der Patienten ACE-Hemmer bzw. Angiotensinrezeptorblocker (92%), Diuretika (81%) sowie beta-Blocker (88%). Weiterhin erhielt ein Teil der Patienten Aldosteronantagonisten (35%), Calciumantagonisten (10%) sowie Glykoside (38%). Eine Übersicht der Patientencharakteristika befindet sich in **Tabelle 1** (S.42).

5.2 Histologische und immunhistochemische Ergebnisse der EMB

Die Ergebnisse der histopathologischen Bewertung der EMB wurden uns durch Herrn Prof. Dr. Gerhard Mall, Institut für Pathologie des Klinikums Darmstadt, freundlicherweise sowohl im Rahmen der klinischen Befunde übermittelt als auch zur wissenschaftlichen Verwendung im Rahmen dieser Arbeit überlassen. Die EMB wurde zum einen nach der Größe der Myozyten und dem Anteil der Fibrose im Gewebe beurteilt. Zum anderen wurden in der EMB das virale Genom, die Expression der HLA-Antigene und der Anteil von T-Lymphozyten und Makrophagen im Gewebe untersucht. Die Ergebnisse der EMB werden in **Tabelle 3** dargestellt. Eine beispielhafte histopathologische Darstellung einer EMB ist in **Abbildung 4** zu finden.

Tabelle 3 Ergebnisse der EMB

	Wert	n*
Myozyten (mikrom)	27.5 ± 5.6	315
Fibrose (%)	4.9 ± 6.8	276
Makrophagen (n/mm ²)	7.6 ± 8.3	278
T-Lymphozyten (n/mm ²)	4.0 ± 4.5	278
HLA Klasse II (<i>moderate/severe</i>)	164 (56)	293
≥ 14 inflammatorische Zellen	87 (31)	278
für Virales Genom positiv	141 (57)	247
für EV-Genom positiv	64 (21)	311

Tab.3 HLA= *human leucocyte antigen* (Anfärbungsintensität semi-quantitativ klassifiziert als *none, mild, moderate* und *severe*); Inflammatorische Zellen (Makrophagen und T-Lymphozyten); EV= Enterovirus

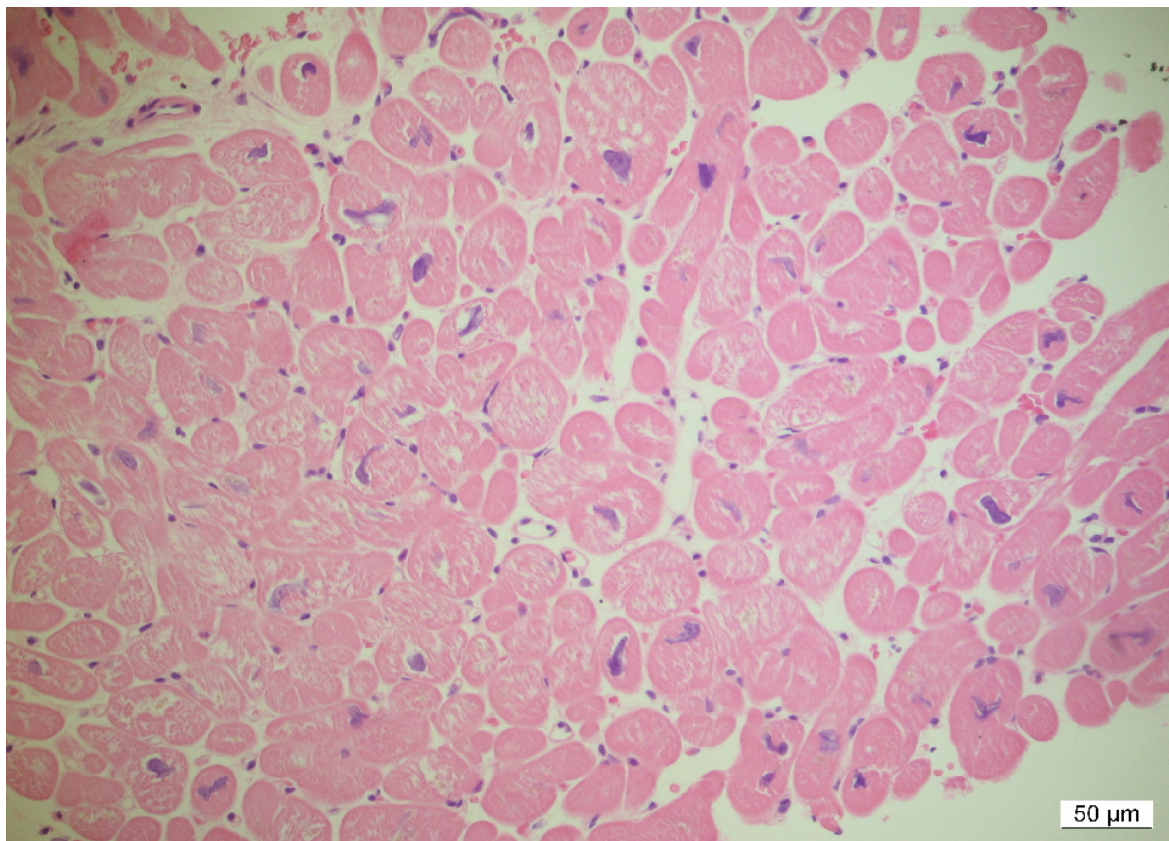


Abb. 4 Exemplarisches Bild einer EMB eines Patienten mit DCM (HE-Färbung). Im Bild sind die für die Erkrankung typischen hypertrophierten Kardiomyozyten zu sehen. Zudem zeigen sich pleomorphe und hyperchrome Zellkerne, die quantitativ rarefiziert erscheinen.

5.3. Expression und Gewebeverteilung von ED-A⁺-Fn, B⁺ Tn-C und ASMA-positiven Zellen im Myokardgewebe

ED-A⁺-Fn konnte im Rahmen der Auswertung mittels cLSM vor allem in räumlicher Assoziation zu Gefäßstrukturen und in Regionen interstitieller Fibrose nachgewiesen werden (**Abb.5.**). Die Negativkontrolle, unter Verzicht auf den Primärantikörper, beweist die Spezifität der Färbung (**Abb.5c**).

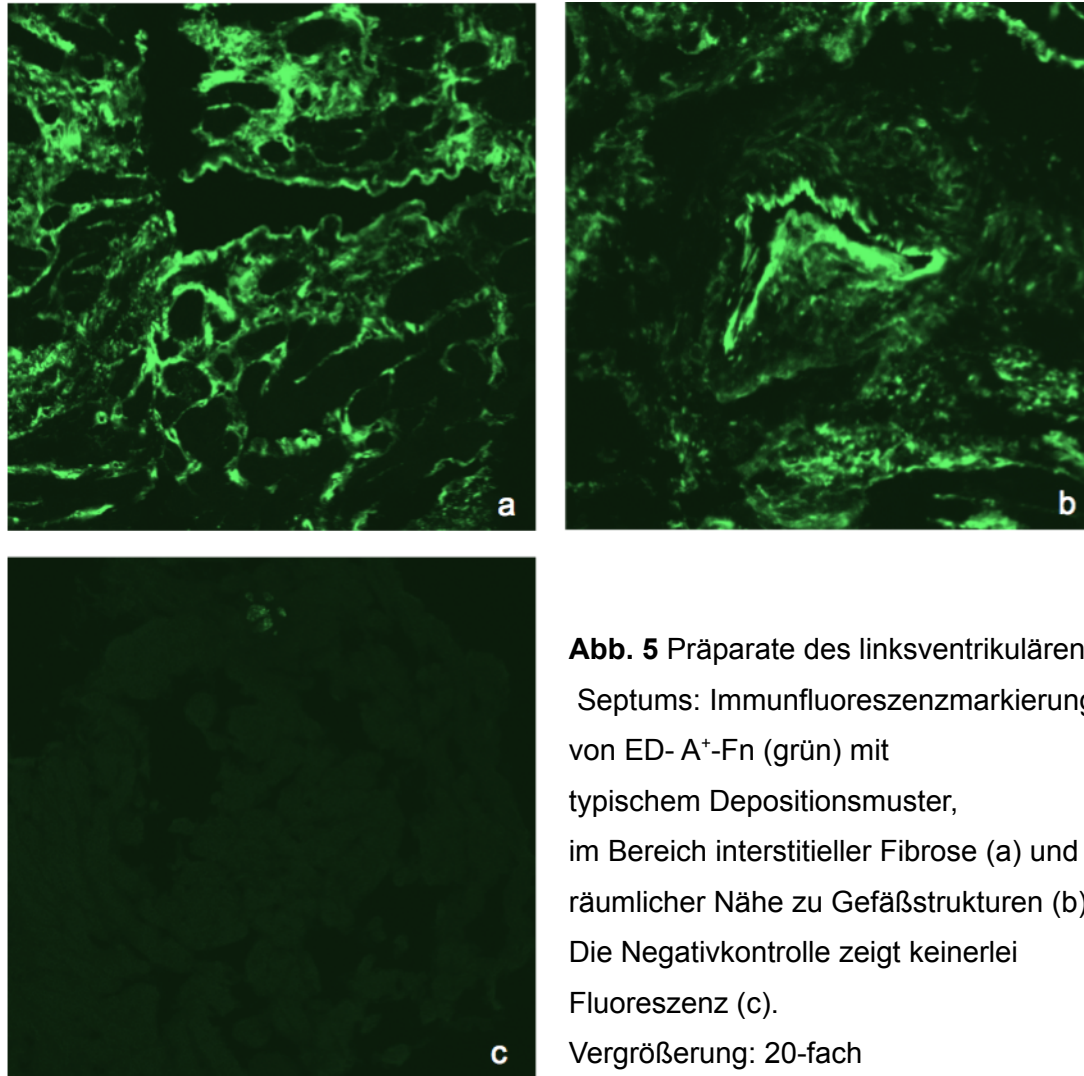


Abb. 5 Präparate des linksventrikulären Septums: Immunfluoreszenzmarkierung von ED- A⁺-Fn (grün) mit typischem Depositionsmuster, im Bereich interstitieller Fibrose (a) und in räumlicher Nähe zu Gefäßstrukturen (b). Die Negativkontrolle zeigt keinerlei Fluoreszenz (c).
Vergrößerung: 20-fach

Weiterhin konnte in der cLSM-Auswertung das bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschriebene Verteilungsmuster von B⁺ Tn-C auch für das Krankheitsbild der DCM verifiziert werden (Baldinger et al. 2011; Franz et al. 2010a). Eine vermehrte Ablagerung des Moleküls fand sich in Bereichen interstitieller und perivaskulärer Fibrose (**Abb.6**). ASMA, welches als Markermolekül von MyoFBs und VSMCs bekannt ist, konnte in unserer aktuellen Untersuchung an myokardialen

Gewebeproben von DCM-Patienten in Bereichen interstitieller Fibrosierungen (MyoFB) und vaskulärer Strukturen (VSMCs) nachgewiesen werden (**Abb.7**).

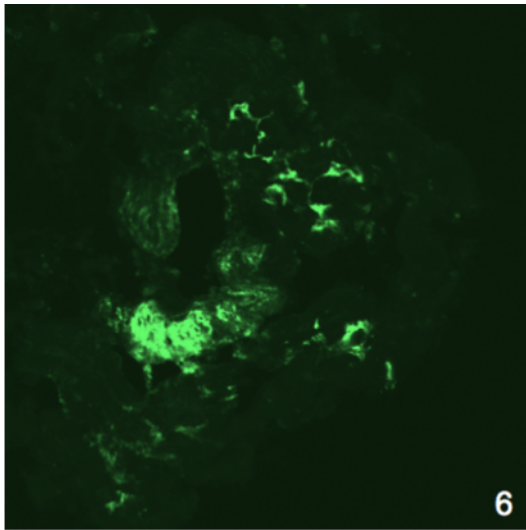


Abb.6 Präparat des linksventrikulären Septums, Immunfluoreszenzmarkierung von B⁺Tn-C (grün) mit typischem Verteilungsmuster, im Bereich interstitieller und perivaskulärer Fibrose. Vergrößerung: 20fach.

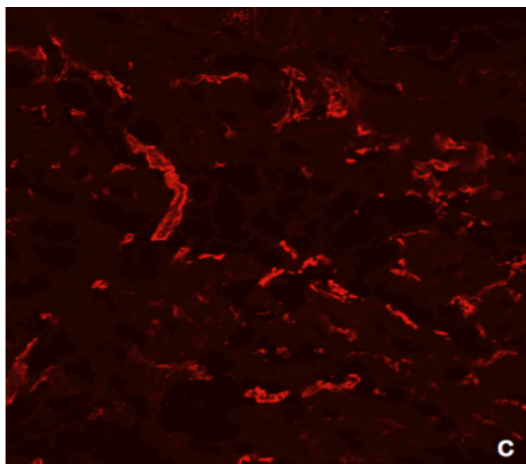
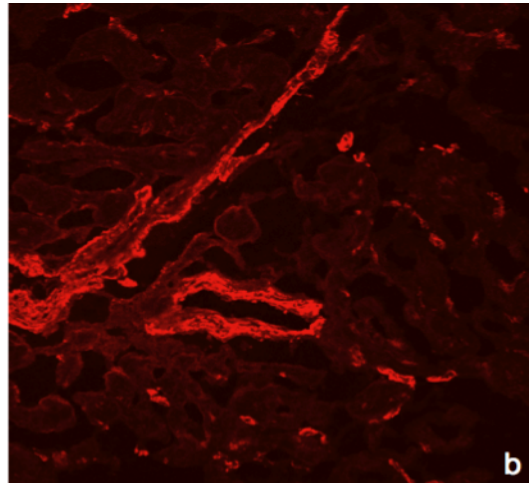
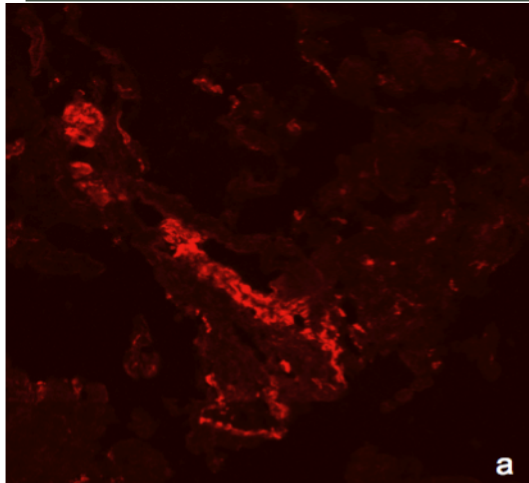


Abb.7 Präparat des linksventrikulären Septums: Immunfluoreszenzmarkierung von ASMA (rot) mit typischem Verteilungsmuster im Bereich interstitieller Fibrose (a,c) und vaskulärer Strukturen(b). Vergrößerung: 20fach

5.4 Analyse des Patientenkollektives hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von klinischen, laborchemischen und EZM- Parametern

Die univariate Analyse klinischer, hämodynamischer, laborchemischer sowie histopathologischer und immunohistochemischer Variablen nach der *Cox-proportional-hazards* Regressionsanalyse zur Darstellung einer möglichen Assoziation verschiedener Variablen zum kombinierten Endpunkt aus Tod und HTx im Zeitraum der Studie erbrachte für die klinischen Parameter hoch- bzw. höchstsignifikante Werte für das NYHA-Stadium ($p < 0,001$), die EF ($p=0,0001$), den LVEDD ($p=0,038$) und die Einnahme eines beta-Blockers ($p=0,003$).

Unter den in dieser Arbeit untersuchten möglichen Biomarkern einer Herzinsuffizienz erwiesen sich die Serumspiegel von B⁺ Tn-C ($p < 0,001$), MMP-9 ($P=0,004$) und TIMP-1 ($p < 0,0001$) als hoch- bzw. höchstsignifikant. Es erfolgte weiterhin eine kombinierte Auswertung aller 3 Serumparameter. Hier wurde unterschieden zwischen der positiven Nachweisbarkeit von mindestens einem der drei Parameter und dem positiven Nachweis aller 3 Parameter zusammen. Beide Auswertungen erbrachten ein höchstsignifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$). Aus der EMB konnten die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeparameter ED-A⁺-Fn ($p=0,005$) und B⁺ Tn-C ($p=0,003$) als signifikant und die Ergebnisse für ASMA-positive Zellen ($p < 0,001$) als hochsignifikant eingestuft werden. Die kombinierte Auswertung aus ED-A⁺-Fn-positiv und ASMA-positiv ($p < 0,001$) erbrachte ein hochsignifikantes Ergebnis. Die Myozytengröße, der Anteil der Fibrose im Gewebe, die Inflammation als auch das virale Genom erbrachten keine signifikanten Ergebnisse.

Um die Bedeutung der signifikanten Ergebnisse von NYHA-Stadium, EF, der Einnahme eines beta-Blockers sowie der kombinierten Auswertung der drei Serumparameter B⁺ Tn-C, MMP-9 und TIMP-1 klarer herauszustellen, wurde eine multivariate Auswertung nach der *Cox-proportional-hazards*-Regressionsanalyse durchgeführt. Im Ergebnis war das NYHA-Stadium III/IV signifikant ($p=0,032$), die EF ($p=0,009$) und die kombinierte Auswertung der Serumparameter (positiv für mindestens einen Parameter) ($p=0,006$) hochsignifikant. In die multivariate Analyse dieser Parameter konnten 172 Patienten eingeschlossen werden. Auf die Hinzunahme der anderen, ebenfalls hochsignifikanten, Daten der univariaten Analyse in die multivariate Analyse wurde zunächst verzichtet, da die Anzahl der zu berücksichtigenden Patienten auf 85 sinken würde und somit die statistische Aussagekraft der in Tabelle 4 dargestellten multivariaten Analyse geschwächt werden

würde. **Tabelle 4** gibt eine Übersicht über die beschriebenen uni- bzw. multivariaten Analysen.

Tabelle 4 Cox-proportional-hazards-Regressionsanalyse im Hinblick auf den kombinierten Endpunkt aus Tod und Transplantation (HTx)

Variable	<u>Univariate Analyse</u>	<i>P</i>	<u>Multivariate Analyse</u>	<i>P</i>
	HR		HR	
Alter (y)	1.01	0.195	1.00	0.972
Geschlecht	0.93	0.803		
NYHA - Stadium		<0.001		
I	1			
II	2.15			
III	3.29			
IV	6.87			
NYHA Stadium III/IV	2.09	0.001	2.30	0.032
Echocardiographie				
EF (%)	0.97	0.0001	0.96	0.009
LVEDD (mm)	1.03	0.038		
Medikation				
ACE/ARB	0.69	0.406		
beta-Blocker	0.42	0.003	0.49	0.188
Serumspiegel von				
B ⁺ Tn-C (ng/ml)	3.07	<0.001		
MMP-9 (ng/ml)	2.27	0.004		
TIMP-1 (ng/ml)	3.85	<0.0001		
Positiv für ≥ 1 Parameter	4.96	<0.0001	3.35	0.006
Positiv für alle 3 Parameter	10.47	<0.0001		

Ergebnisse der Endomyokardbiopsie				
Myozyten (µm)	1.01	0.554		
Fibrose (%)	1.01	0.448		
Makrophagen (n/mm ²)	1.01	0.416		
T-Lymphocyten (n/mm ²)	0.98	0.394		
HLA-Klasse II (moderat/stark)	1.11	0.672		
≥ 14 inflammat. Zellen vs. < 14 Zellen	0.96	0.876		
≥ 14 inflammat. Zellen vs. < 3 Zellen	1.10	0.752		
Virales Genom	0.66	0.139		
EV-Genom	1.39	0.202		
ED-A ⁺ -Fibronectin (%)	3.21	0.005		
B ⁺ Tn-C (%)	4.28	0.003		
ASMA-positive Zellen (%)	2.77	<0.001		
ED-A ⁺ -Fn u. für ASMA-pos. Zellen posi.	6.60	<0.001		

Tab.4. Alter, NYHA-Stadium, Ejektionsfraktion, Medikation mit beta-Blocker und Serumspiegel für entweder B⁺ Tn-C, MMP-9 oder TIMP-1 gingen in die multivariate Analyse auf der Basis der univariaten Analyse ein. HTx = Herztransplantation; EF= Ejektionsfraktion; LVEDD= linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; ACE= *angiotensin-converting enzyme*; ARB=Angiotensin-Rezeptor- Blocker; MMP=matrix metalloproteinase, TIMP=*tissue inhibitor of metalloproteinases*; HLA=*human leucocyte antigen* (Anfärbungsintensität semi-quantitativ klassifiziert als *none*, *mild*, *moderate* oder *severe*); Inflammatorische Zellen (Makrophagen und T-Lymphocyten); EV= Enterovirus

5.5 Kaplan-Meier-Analysen zur Korrelation des Überlebens der Patienten mit den klinischen, histopathologischen sowie immunhistochemischen Daten

Unter Verwendung einer Kaplan-Meier-Analyse wurden unsere Daten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Prognose der Patienten, gemessen als Endpunkt aus Tod oder Herztransplantation, analysiert. Zunächst erfolgte neben der Analyse der diesbezüglichen Bedeutung der linksventrikulären Funktion und des NYHA-Stadiums eine Darstellung der in der Fachwelt kontrovers diskutierten Einflussgrößen bei DCM, nämlich der Inflammation und des Virusgenoms. Um eine vergleichende Analyse der Untersuchungsergebnisse darzustellen, wurden die Daten dichotomisiert.

Für die Betrachtung des Einflusses des NYHA-Stadiums auf das Überleben des Patientenkollektivs liessen sich 145 Patienten mit NYHA Stadium I/II 150 Patienten mit NYHA Stadium III/IV gegenüberstellen. Es besteht ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen beiden Gruppen ($p=0.001$). Patienten mit NYHA Stadium I oder II haben eine signifikant längere Überlebenszeit als Patienten mit NYHA Stadium III oder IV. Nach 156 Monaten sind 50% der Patienten im NYHA-Stadium I/II verstorben, während in der Gruppe der Patienten im NYHA-Stadium III/IV bereits nach 100 Monaten 50% verstorben sind. Damit ist das NYHA-Stadium ein hochsignifikanter Prognoseparameter hinsichtlich des Überlebens bei Patienten mit DCM (**Abb.8**).

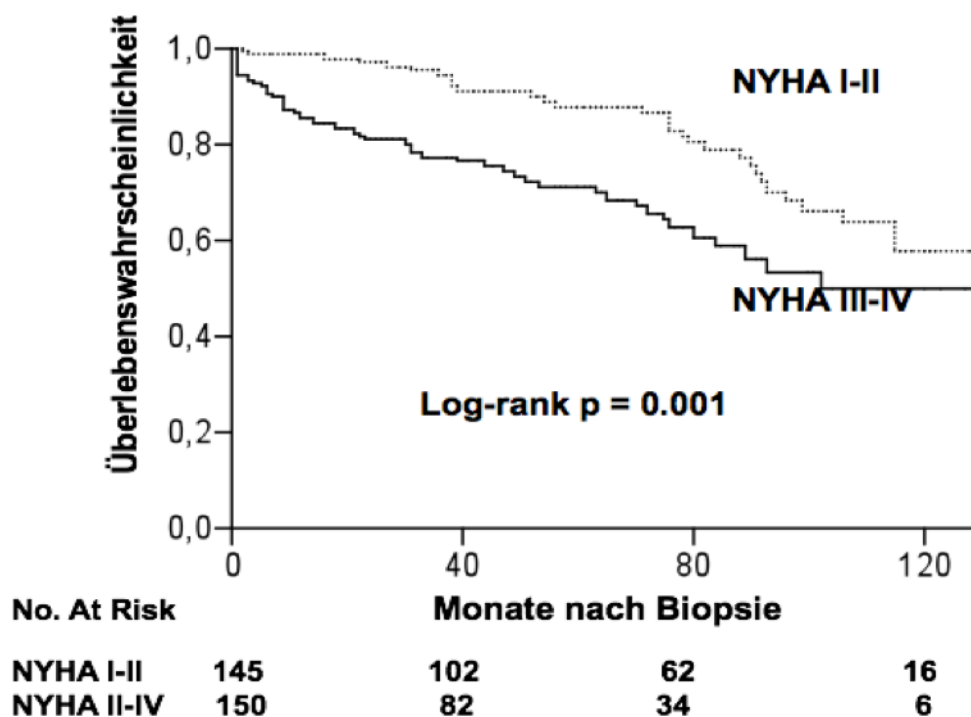


Abb.8 Kaplan-Meier- Analyse NYHA-Stadium I/II versus NYHA-Stadium III/IV

Zur Analyse des Einflusses der EF auf das Überleben der Patienten wurden die Daten anhand des Medianes der EF (Median= 30%) dichotomisiert und vergleichend dargestellt. Patienten mit einer EF \geq Median haben eine hochsignifikant längere Überlebenszeit als Patienten mit einer EF $<$ Median ($p=0.004$). In der Gruppe der Patienten, deren EF größer/gleich dem Median ist, sind nach 150 Monaten 50% der Patienten verstorben. In der Gruppe der Patienten mit einer EF unterhalb des Medians sind bereits nach 102 Monaten 50% der Patienten verstorben. Aus dieser Darstellung lässt sich ableiten, dass die EF ein signifikanter Parameter hinsichtlich des Überlebens bei Patienten mit DCM ist (**Abb.9**).

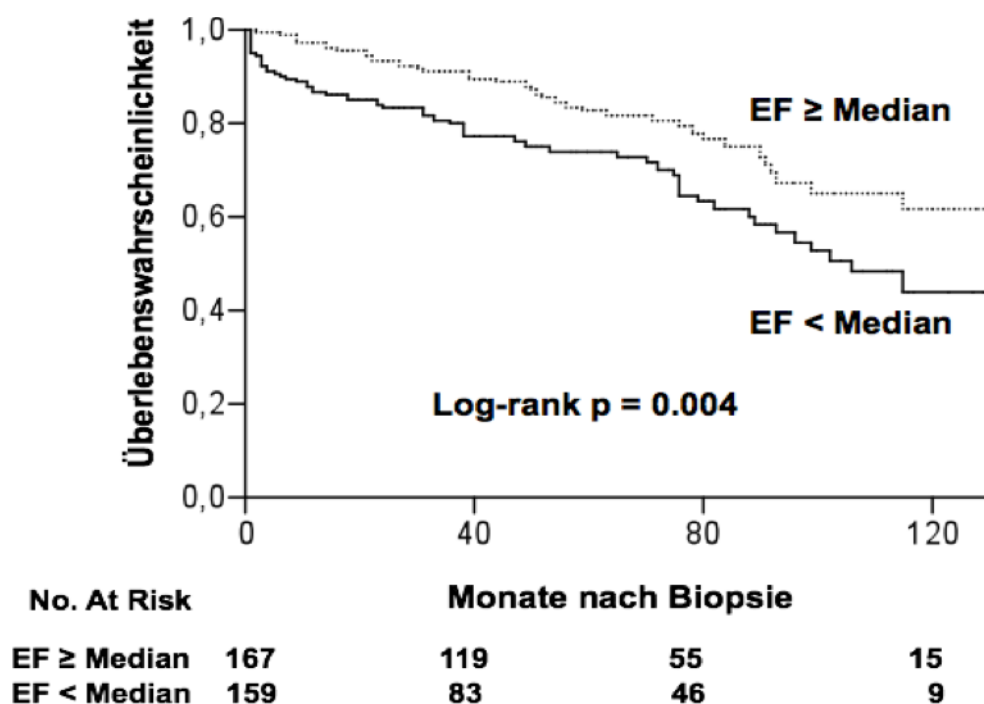


Abb.9 Kaplan-Meier-Analyse EF \geq Median versus EF $<$ Median

Bezüglich des viralen Genoms wurde das Patientenkollektiv dichotomisiert in Patienten mit einem positiven Virusnachweis in der EMB ($n=141$) und Patienten mit einem negativen Virusnachweis in der EMB ($n=106$). Für beide Patientengruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit ($p=0.145$) (**Abb.10**).

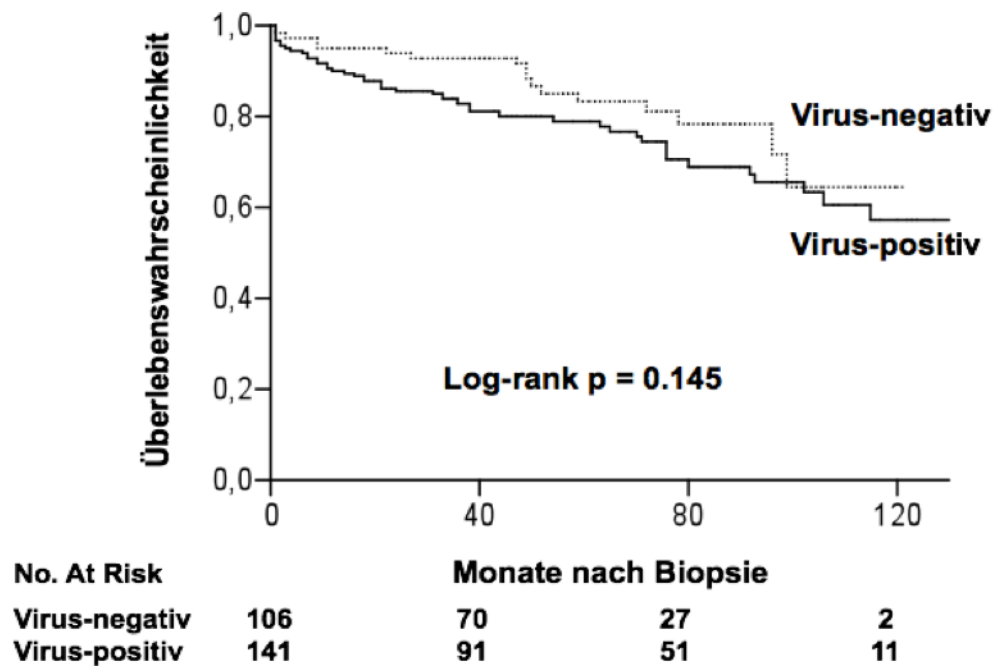


Abb.10 Kaplan-Meier-Analyse Virus-positiv versus Virus-negativ

Eine differenzierter Vergleich zwischen Enterovirus-positiven (n=64) und Enterovirus-negativen (n=247) Patientengruppen erbrachte hinsichtlich der Überlebenszeit ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (p=0.212) (**Abb.11**).

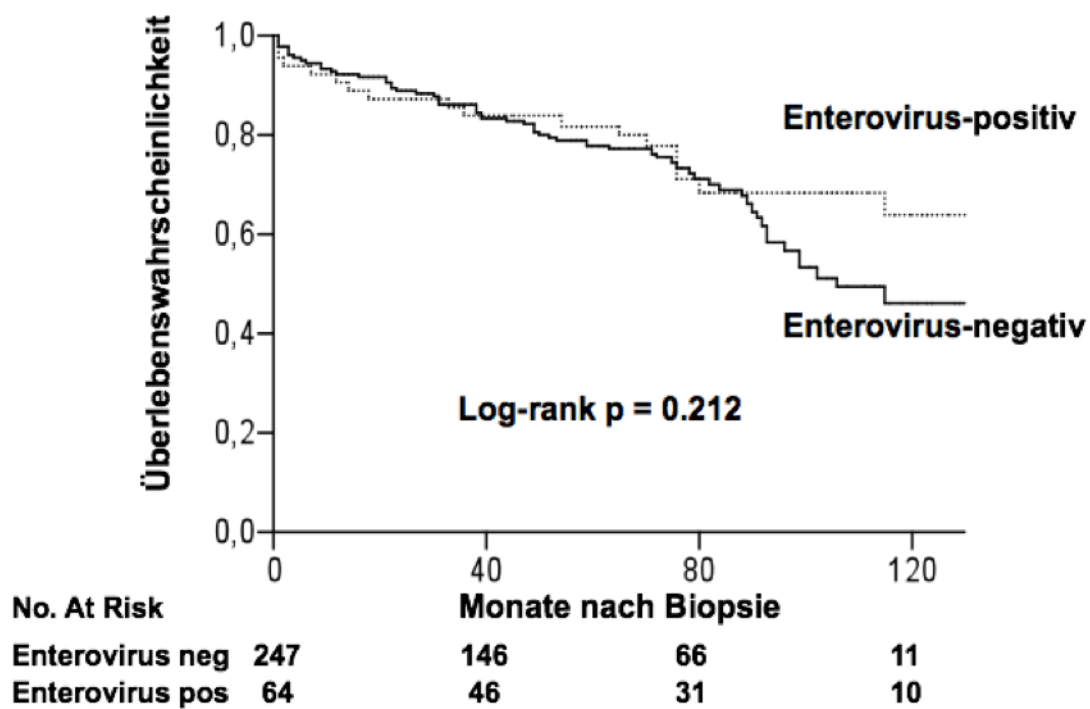


Abb.11 Kaplan-Meier-Analyse Enterovirus-positiv versus Enterovirus-negativ

Um die Patienten mit einem inflammatorischen Prozess im Gewebe jenen ohne Inflammation gegenüber zu stellen, erfolgte eine Unterteilung gemäß WHO-Kriterien in Patienten mit < 14 inflammatorischen Zellen ($n=191$) und Patienten mit ≥ 14 inflammatorischen Zellen ($n=87$). Es konnte zwischen beiden Patientengruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit gefunden werden ($p=0.876$; **Abb.12**)

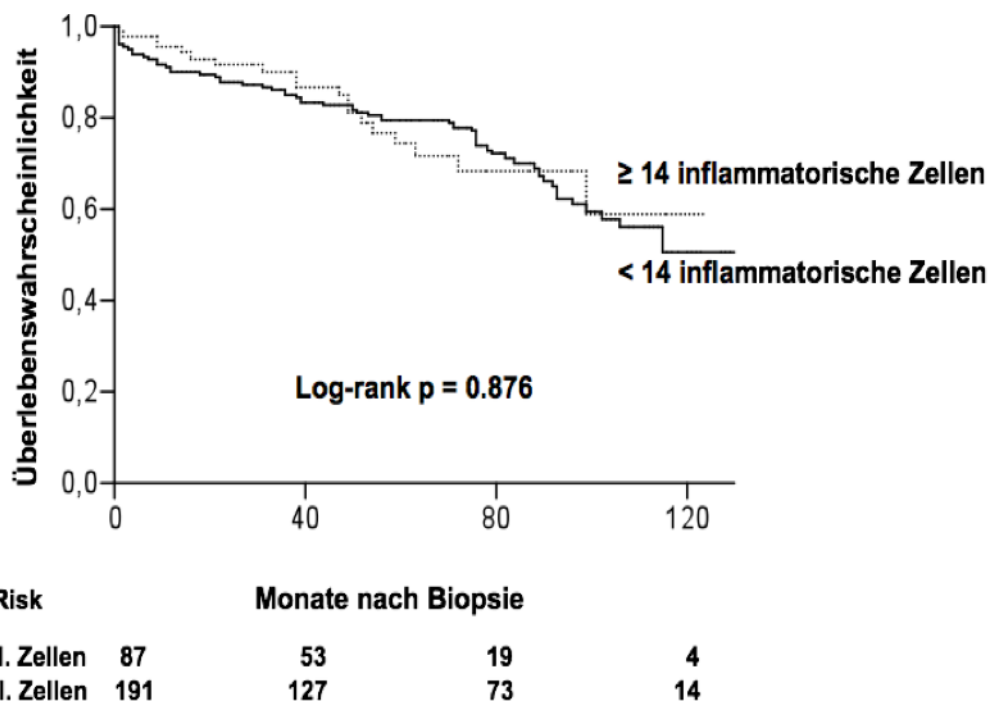


Abb.12 Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit einem inflammatorischen Prozess versus ohne

Da Befunde von Patienten mit weniger als 3 entzündlichen Zellen in der EMB im Hinblick auf Inflammation als Normalbefund betrachtet werden, stellten wir die Gruppe von ≥ 14 inflammatorischen Zellen jener mit < 3 entzündlichen Zellen gegenüber. Auch hier findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen ($p=0.752$; **Abb.13**)

Basierend auf der Annahme, dass die HLA-Expression im Myokard indikativ für einen chronischen autoimmunen bzw. inflammatorischen Prozess ist, wurde die Bedeutung der HLA-Expression in unserem Patientenkollektiv zusätzlich zur Infiltration mit entzündlichen Zellen betrachtet. Es erfolgte eine Dichotomisierung des Patientenkollektivs hinsichtlich der Merkmale HLA II *moderate/serve* + ≥ 14 inflammatorischen Zellen, ($n=42$), und HLA II *none/mild* + < 14 inflammatorischen

Zellen, (n=85). Zwischen beiden Patientengruppen ergab sich hinsichtlich der Überlebenszeit kein signifikanter Unterschied ($p=0.329$; **Abb.14**).

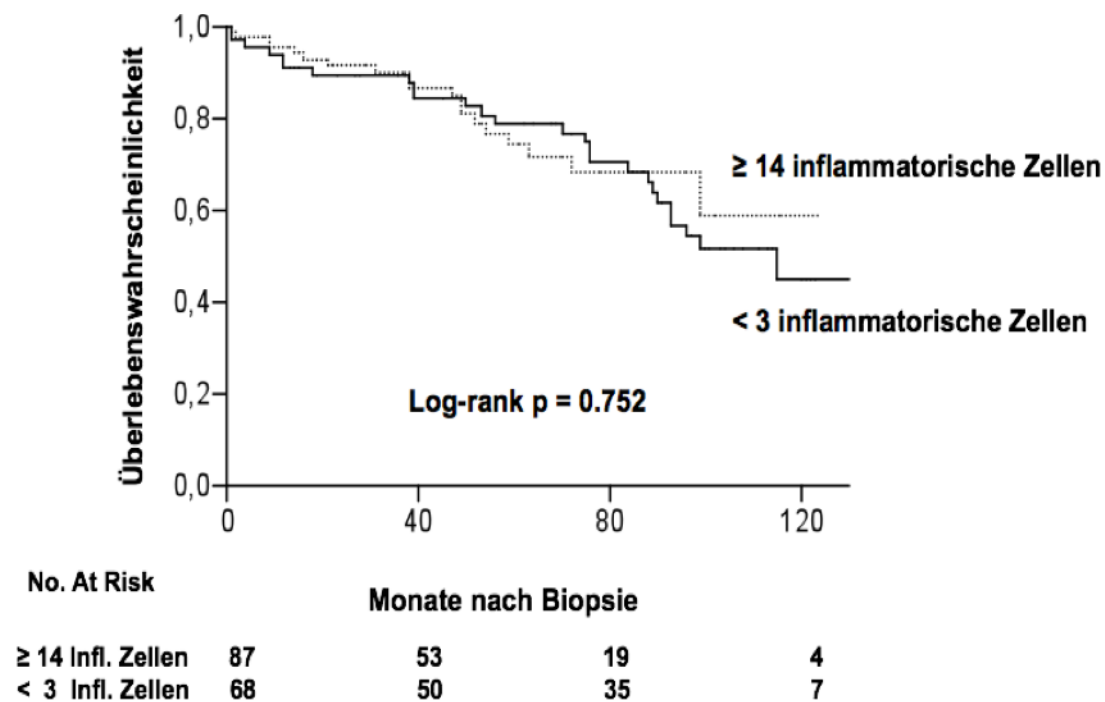


Abb. 13 Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit inflammatorischem Befund versus ohne

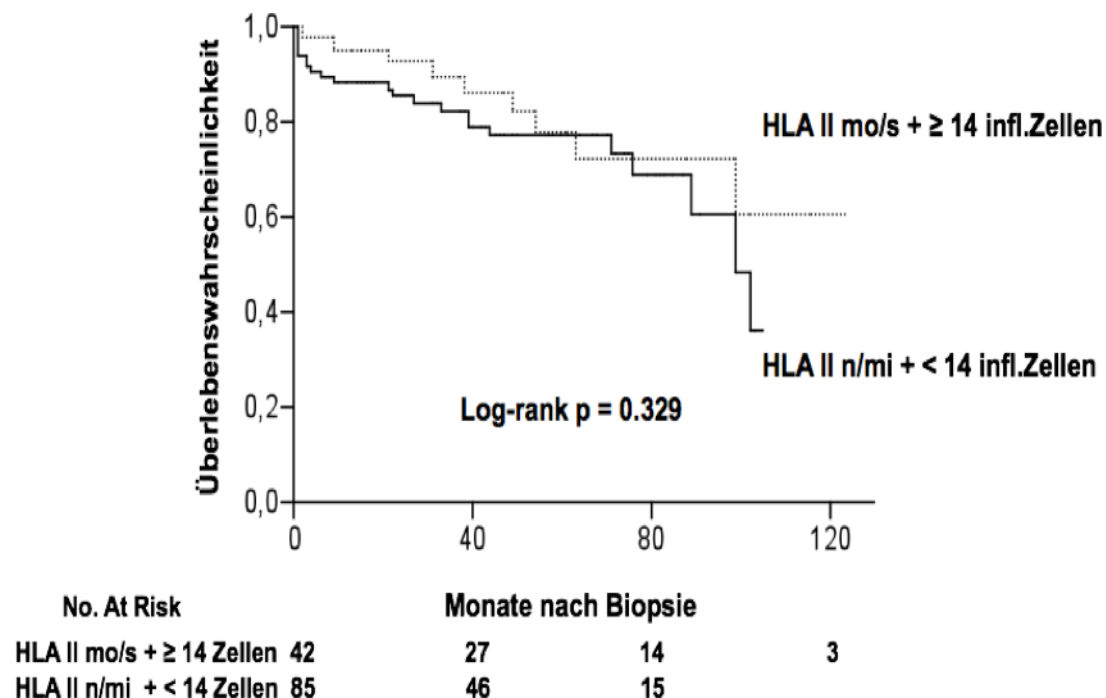


Abb.14 Kaplan-Meier-Analyse hinsichtlich der Patienten der Gruppe: HLA II *moderate/severe* + ≥14 inflammatorischen Zellen und der Gruppe: HLA II *none/mild* + < inflammatorische Zellen

Hinsichtlich der Serumparameter B⁺ Tn-C, MMP-9 und TIMP-1 erfolgte die Dichotomisierung der Merkmale in B⁺ Tn-C- positiv (n= 40) versus B⁺ Tn-C-negativ (n=177) , in MMP-9-positiv (n=67) versus MMP-9- negativ (n=151) und in TIMP-1- positiv (n=132) versus TIMP-1-negativ (n=86). Hinsichtlich der Überlebenszeit zeigte sich bei allen drei Serumparametern ein hochsignifikanter bzw. höchstsignifikanter Unterschied, (MMP-9 p=0.002; TIMP-1 p<0.0001; B⁺-Tn-C p<0.0001). TIMP-1 stellt sich in dieser Darstellung als aussagekräftigster Parameter dar (**Abb.15a,b,c**). Außerdem erfolgte eine kombinierte Betrachtung der Serumparameter. Dabei zeigte sich, dass, je mehr Parameter positiv sind, die Überlebenswahrscheinlichkeit sukzessive abnimmt (**Abb.16**).

Teilt man das Patientenkollektiv ein in eine Gruppe von Patienten, die für keinen Serumparameter positiv ist und in eine Gruppe, die für mindestens einen Parameter positiv ist, so zeigt sich ein höchstsignifikanter Unterschied im Hinblick auf das Überleben (p<0001). In der Gruppe der Patienten ohne positiven Serumparameter für B⁺ Tn-C, MMP-9 oder TIMP-1 sind nach 150 Monaten 50% der Patienten verstorben. In der Gruppe der Patienten mit mindestens einem positiven Serumparameter für B⁺ Tn-C, MMP-9 oder TIMP-1 sind bereits nach 93 Monaten 50% der Patienten verstorben (**Abb.17**).

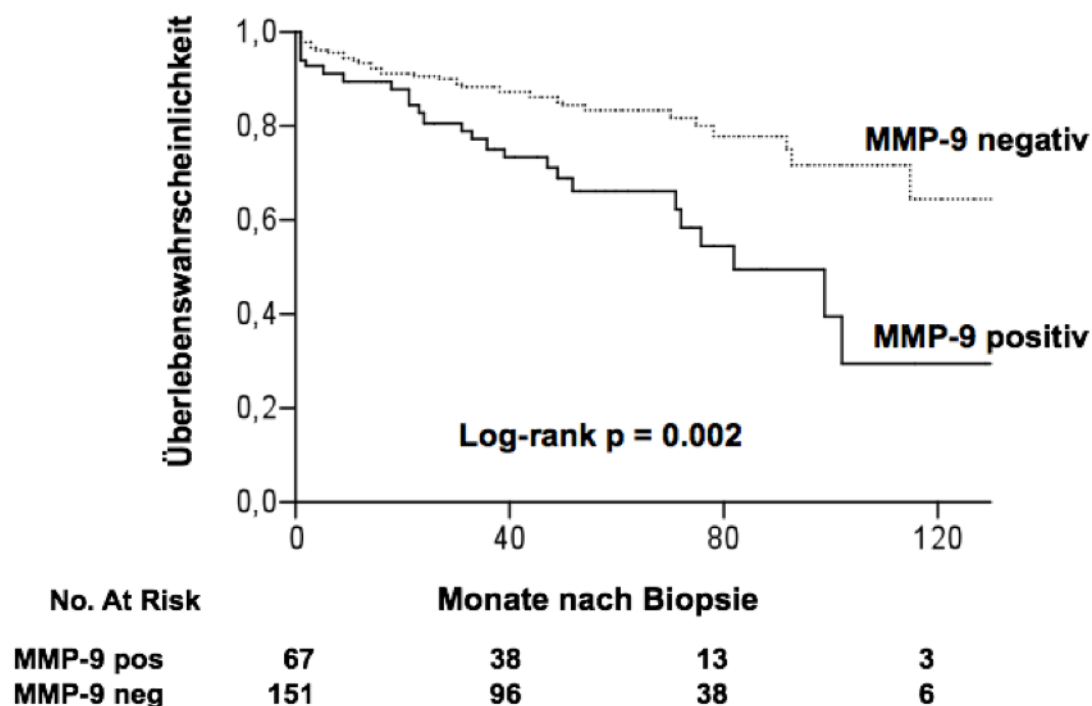


Abb.15a Kaplan-Meier-Analyse MMP-9-negativ versus MMP-9-positiv

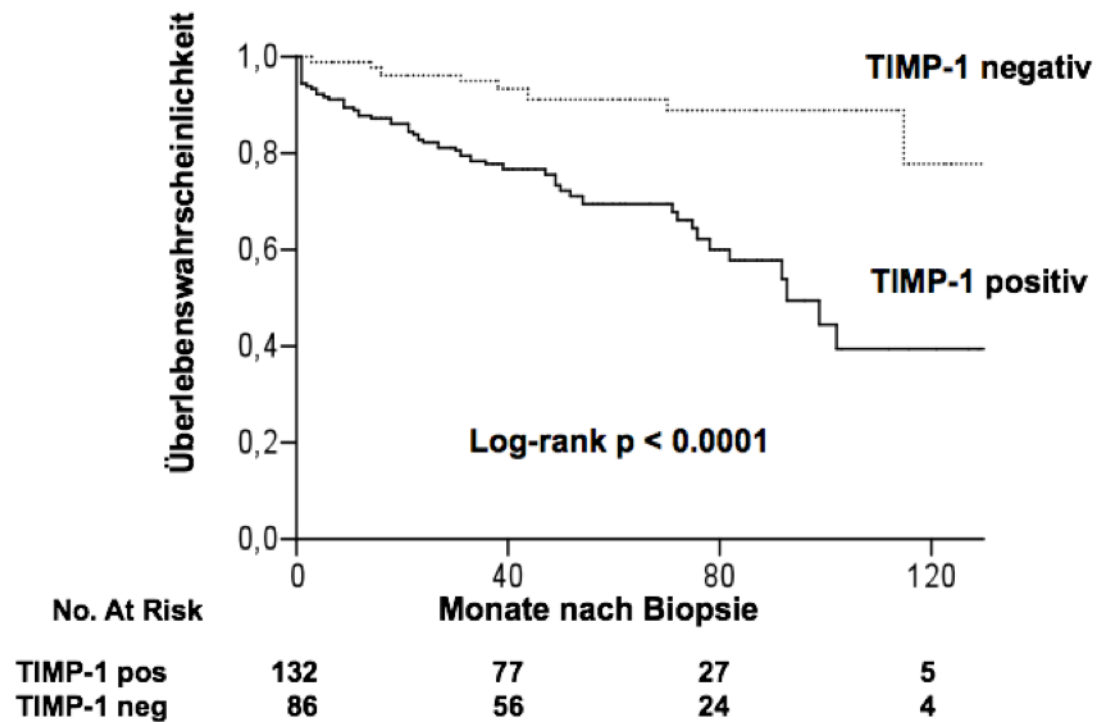


Abb.15b Kaplan-Meier-Analyse TIMP-1-positiv versus TIMP-1-negativ

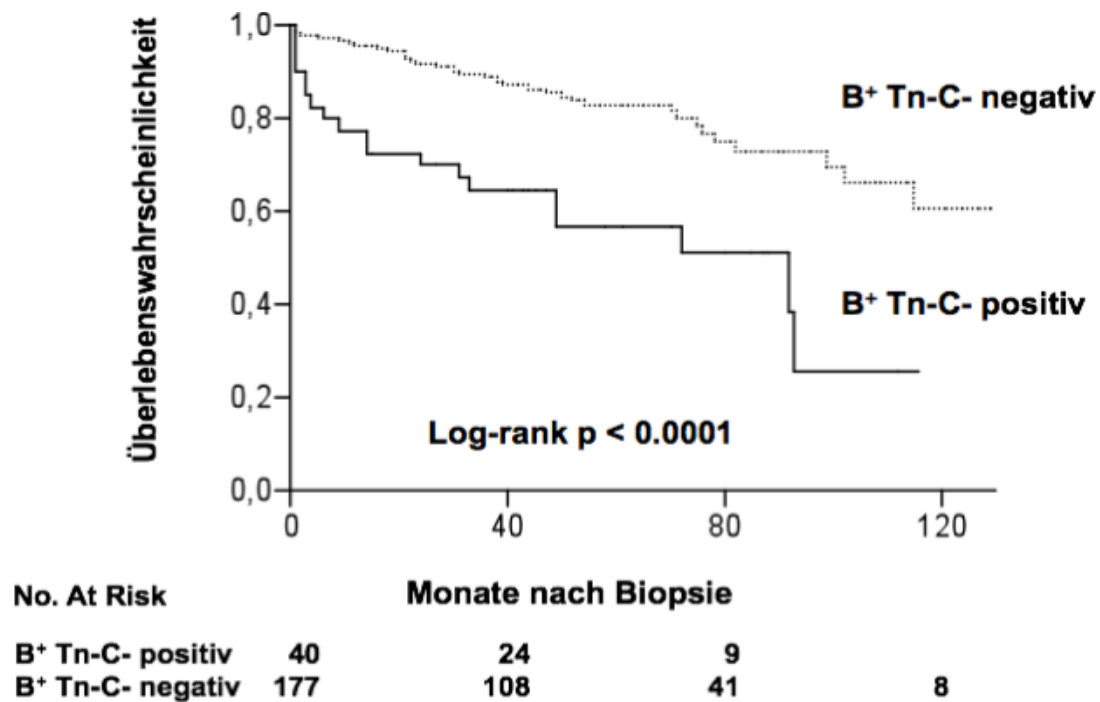


Abb.15c Kaplan-Meier-Analyse B⁺Tn-C- negativ versus B⁺Tn-C- positiv

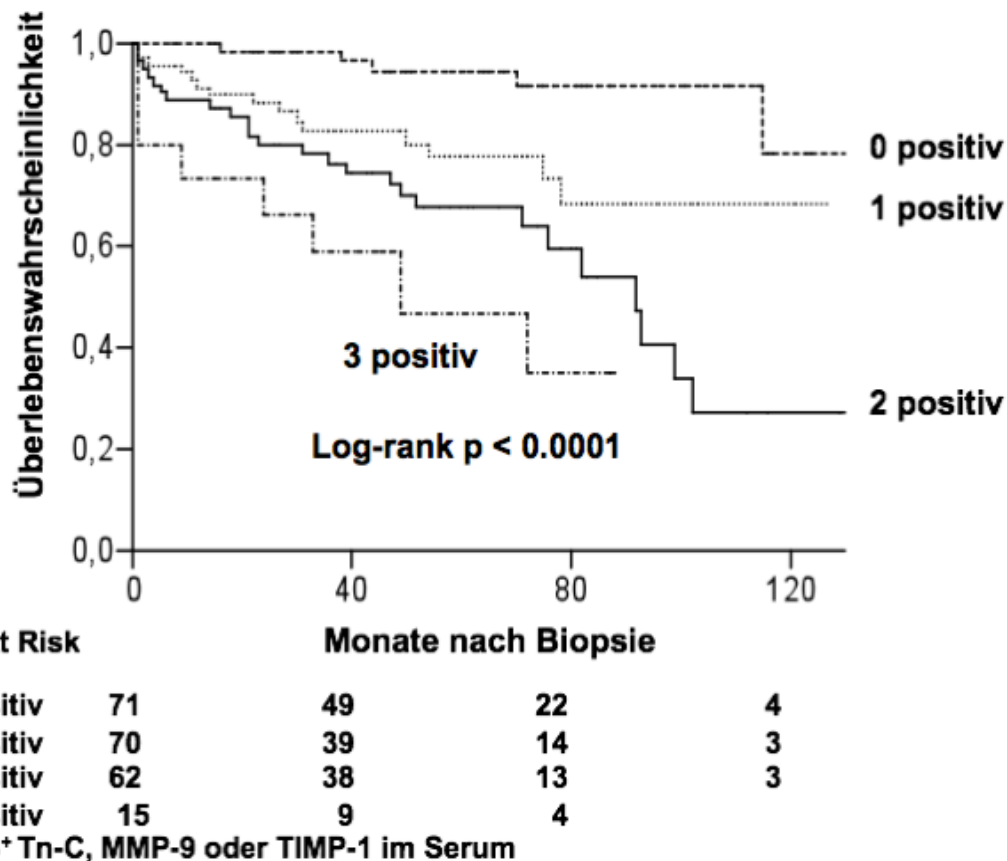


Abb.16 Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten Darstellung des Einflusses von B⁺Tn-C, MMP-9 und TIMP-1 im Serum

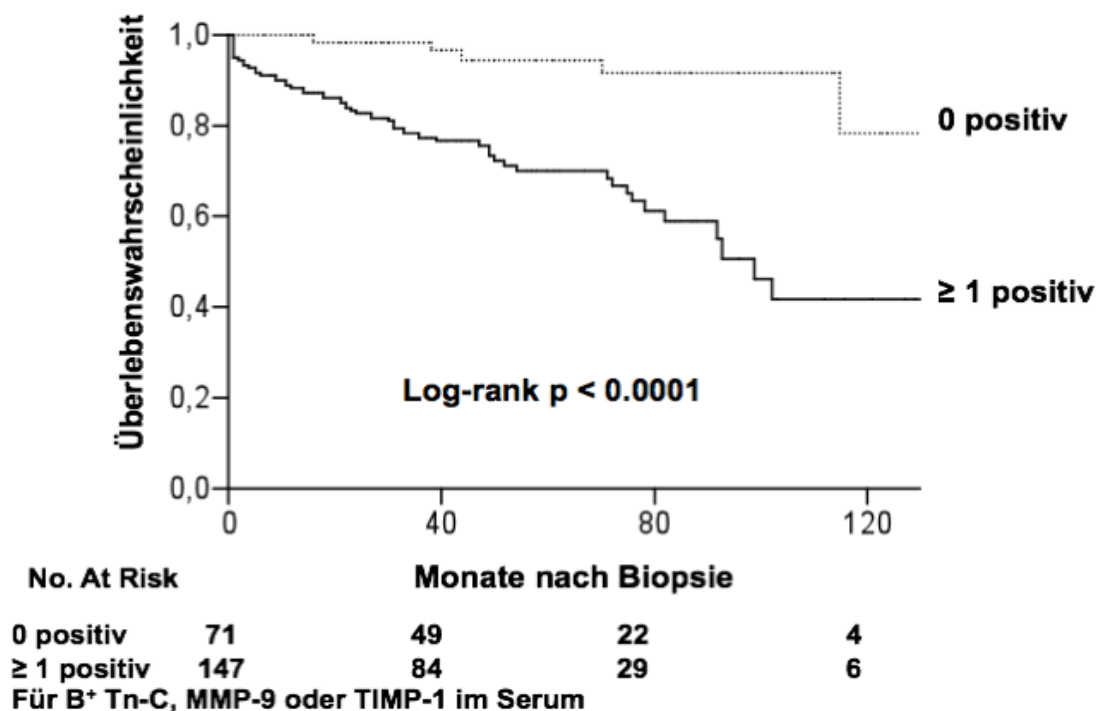


Abb. 17 Kaplan-Meier-Analyse der Gruppen für keinen der Serumparameter positiv versus für einen und mehr Serumparameter positiv

Hinsichtlich der Gewebeparameter B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn und ASMA-positive Zellen erfolgte die Dichotomisierung der Merkmale in B⁺ Tn-C- positiv (n= 12) versus B⁺ Tn-C-negativ (n=148) , in ED-A⁺-Fn-positiv (n=111) versus ED-A⁺-Fn-negativ (n=47) und in positiv für ASMA-exprimierende Zellen (n=50) versus negativ für ASMA-exprimierende Zellen (n=171). Hinsichtlich des Überlebens zeigte sich bei allen drei Gewebeparametern ein hochsignifikanter bzw. höchstsignifikanter Unterschied (B⁺-Tn-C: p=0.0002; EDA⁺-Fn: p=0.009; ASMA-positive Zellen: p=0.0002; **Abb.18a,b,c**). Für die Gewebeparameter erfolgte ebenfalls eine kombinierte Darstellung. Teilt man das Patientenkollektiv ein in eine Gruppe von Patienten, die für keinen Gewebeparameter positiv ist und in eine Gruppe, die für ED-A⁺-Fn und/oder ASMA-exprimierende Zellen positiv ist, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Überleben (p=0.003). In der Gruppe der Patienten, deren Herzmuskelbiopsie weder für ED-A⁺-Fn noch für ASMA-exprimierende Zellen positiv ist, sind nach 110 Monaten 50% verstorben. In der Gruppe der Patienten, deren Herzmuskelbiopsie für mindestens einen der beiden Parameter positiv ist, sind bereits nach 99 Monaten 50% der Patienten verstorben (**Abb.19**).

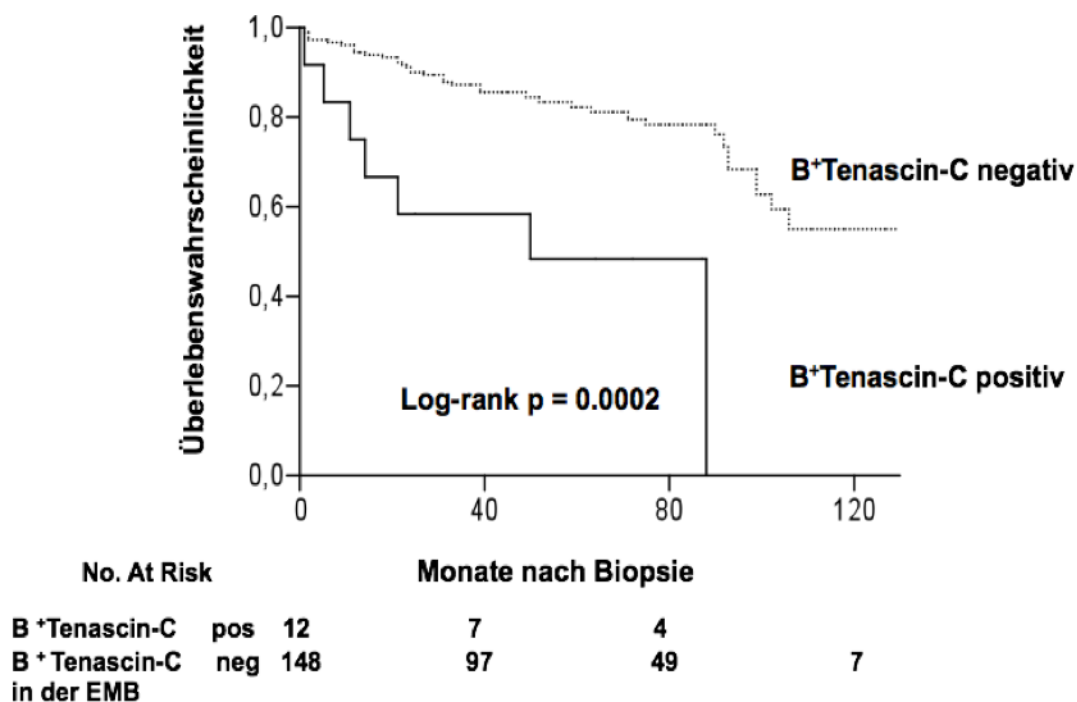


Abb.18a Kaplan-Meier-Analyse für B⁺-Tenascin-C im Gewebe der EMB

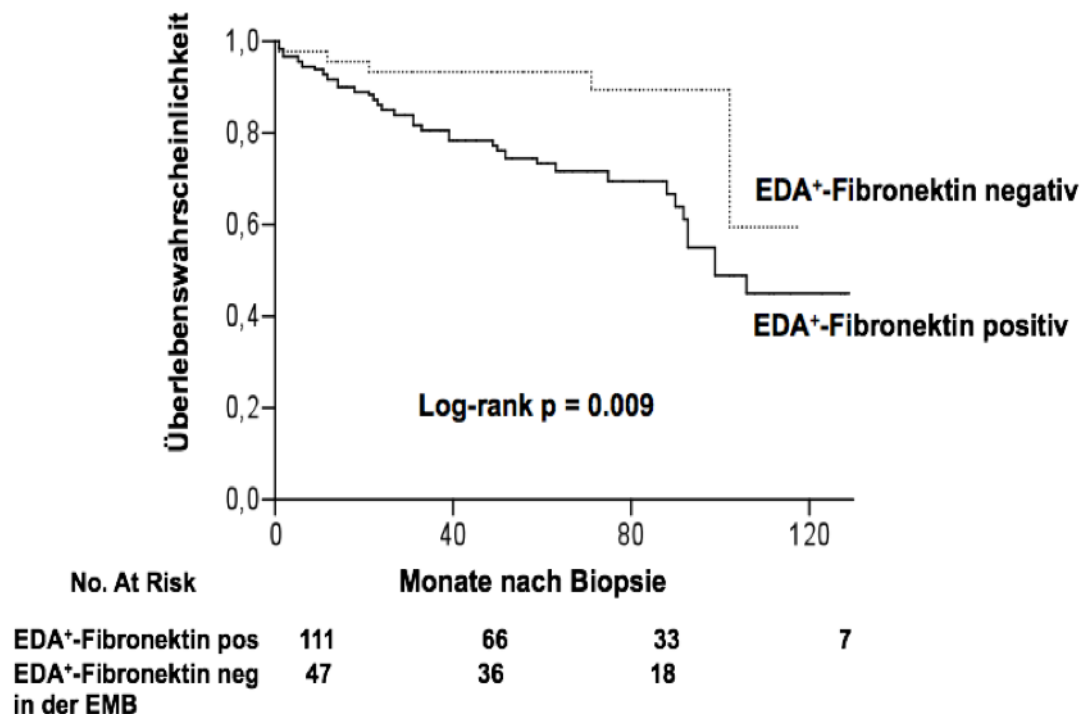


Abb.18b Kaplan-Meier-Analyse ED-A⁺- Fibronectin im Gewebe der EMB

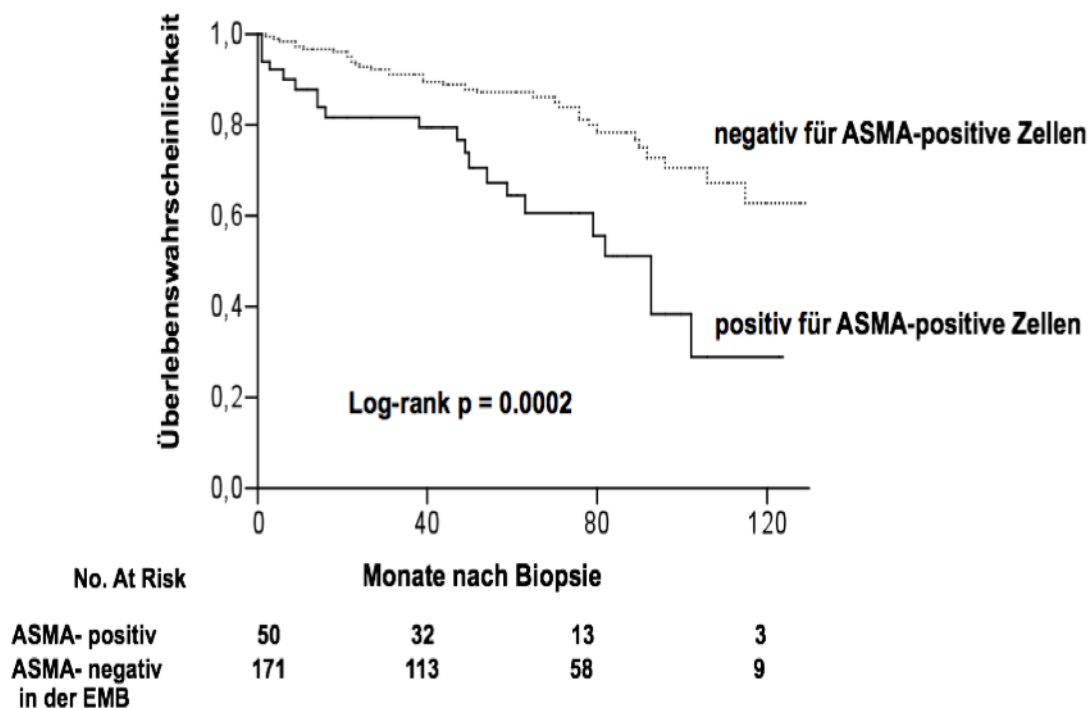
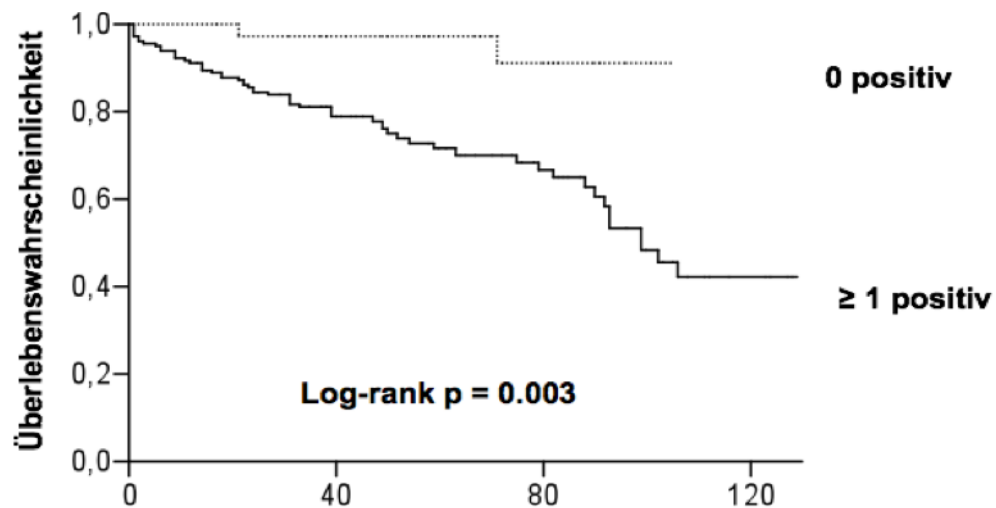


Abb.18c Kaplan-Meier-Analyse ASMA-positiver Zellen



No. At Risk		Monate nach Biopsie			
0 positiv	35	28	13		
≥ 1 positiv	133	82	40	8	
für EDA-Fibronectin und/oder ASMA-positive Zellen im Gewebe der EMB					

Abb.19 Kaplan-Meier-Analyse der Gruppe, die weder für EDA⁺-Fn noch für ASMA-positive Zellen positiv ist versus der Gruppe, die für mindestens einen der Parameter positiv ist

6. Diskussion

Das Krankheitsbild der DCM präsentiert sich klinisch als progressive linksventrikuläre Dilatation sowie Dysfunktion bis hin zum Herzversagen. Innerhalb der Erkrankungsentität sind sowohl das Ausmaß der strukturellen Herzschrädigung als auch die Erkrankungsschwere individuell unterschiedlich. Genauere Ursachen hierfür sind, besonders im Fall der idiopathischen DCM, nicht bekannt. Oftmals werden DCM-Patienten aufgrund der variablen klinischen Präsentation und fehlender Verfügbarkeit von verlässlichen Parametern der Risikostratifizierung zu spät behandelt (Kanzaki et al. 2001). Die Aussagen, die uns die EMB hinsichtlich der Fibrose und der Inflammation des Gewebes und damit über den Krankheitsverlauf liefern kann, sind nicht eindeutig und wurden so auch in verschiedenen Arbeiten kontrovers dargestellt (D'Ambrosio et al. 2001; Kindermann et al. 2008; Kuethe et al. 2007; Kuhn et al. 2005; Mason 2003; Okuno et al. 1989; Woolf et al. 1989).

Bisher existieren keine Biomarker, die verlässliche Aussagen über die Aktivität des Erkrankungsprozesses im Hinblick auf die Prognose des Patienten liefern können. Anhand solcher Biomarker ließen sich möglicherweise bereits in frühen Erkrankungsstadien prädiktive Aussagen zur Prognose der Patienten treffen. Davon abgeleitet könnte man bereits im Zeitpunkt der initialen Präsentation des Patienten individuelle Therapieentscheidungen treffen und mit geeigneten Behandlungsstrategien beginnen. Im Ergebnis würde dies eine bessere therapeutische Zugänglichkeit der Erkrankung mit einer möglichen höheren Überlebenswahrscheinlichkeit bedeuten.

Im Rahmen verschiedener Myokarderkrankungen kommt es zum Geweberemodelling, welches strukturelle und funktionelle Alterationen von insbesondere KMs und FBs sowie eine Reorganisation der EZM beinhaltet. Es ist Ausdruck kardialer Gewebsumbauprozesse in Anpassung an veränderte Umweltbedingungen mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität. Verschiedene Komponenten der EZM, KMs, FBs, VSMCs und EndZs sowie verschiedene Wachstumsfaktoren, Interleukine, Zytokine und andere sowohl körpereigene als auch körperfremde Stimuli sind in diesen Prozess involviert. Als Konsequenz des pathologischen kardialen Remodellings kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Herzmuskelgewebe sowie in Gefäßstrukturen,

welche sich dann histologisch als kardiale oder vaskuläre Fibrosierung präsentieren (Graham et al. 2008; Ju et al. 1996; Pelouch et al. 1993; Swan 1994).

Die EZM wurde aufgrund ihrer Bedeutung für das kardiale *Remodelling* in den letzten Jahrzehnten hinsichtlich ihres Verhaltens während verschiedener Krankheitsprozesse am Herzen umfangreich untersucht. Ihre Komponenten können eine fördernde oder hemmende Rolle im Rahmen der Pathogenese und Progression kardialer Erkrankungen einnehmen. Dies kann folgerichtig entweder zur Ausheilung des kardialen Gewebes oder zur progredienten linksventrikulären Dilatation mit konsekutiver Herzinsuffizienz führen (Bowers et al. 2010).

In unserer Studie ist es gelungen, anhand eines repräsentativen Kollektivs von 326 Patienten mit DCM einen Zusammenhang zwischen einigen für das pathologische myokardiale *Remodelling* wesentlichen Komponenten der EZM, namentlich MMP-9, ED-A⁺-Fn, B⁺-Tn-C, TIMP-1 und ASMA-positiven Zellen und der Prognose der Patienten aufzuzeigen. Die vermehrte Nachweisbarkeit dieser Parameter im kardialen Gewebe und/oder im Serum der Patienten reflektiert dabei das Ausmaß des kardialen *Remodelling*prozesses, welcher mit der Prognose des DCM-Patienten assoziiert zu sein scheint.

6.1 Die Bedeutung klinischer Parameter in der Diagnostik und für die Prognoseabschätzung der DCM

6.1.1. Virales Genom und Inflammation

Der Einfluss sowohl des Virusgenoms als auch der Inflammation im Rahmen der Pathogenese und Progression der DCM wird in der Fachwelt kontrovers diskutiert. Zum einen kann in bis zu 60% der Patienten mit einer DCM virales Genom nachgewiesen werden (Kuhl et al. 2005). Zum anderen existieren Untersuchungen dazu, dass der Nachweis viralen Genoms bei DCM nicht spezifisch zur Diagnosestellung beiträgt (Okuno et al. 1989; Woolf et al. 1989). In unserer Studie konnten wir keinerlei Einfluss viralen Genoms auf die Prognose von DCM-Patienten zeigen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass der Nachweis viralen Genoms bei DCM-Patienten bzw. bei Patienten mit Verdacht auf Myokarditis keinen Einfluss auf die Prognose des Patienten hat (Kueth et al. 2007; Kindermann et al. 2008). Neben der Betrachtung der Bedeutung des viralen Genoms für die Prognose des Patienten im Allgemeinen untersuchten wir

ebenfalls die Rolle von Enteroviren, da diese tierexperimentell am besten in der Pathogenese der virusassoziierten DCM untersucht sind. Für das Enterovirus konnte nachgewiesen werden, dass seine Protease in der Lage ist, Dystrophin zu spalten, welches eine Rolle in einem der pathophysiologischen Erklärungsmodelle der DCM spielt (Badorff et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte auch für das Enterovirus keine relevante Bedeutung für die Prognose der Patienten mit DCM gefunden werden. Für das Parvovirus ist bekannt, dass eine Infektion in der Kindheit oftmals inapparent verläuft oder phänotypisch als Ringelröteln in Erscheinung tritt. Infolge dessen ist das Genom von Parvoviren lebenslang in Geweben und damit auch im Herzen nachweisbar, ohne Hinweis auf einen aktiven Krankheitsprozess zu sein. Die PCR ist eine hochempfindliche Technik, die den Nachweis von Virusgenom und Virusgenomfragmenten im Gewebe erlaubt. Der entsprechende Virusnachweis ist jedoch nicht gleichbedeutend mit der Tatsache, dass eine aktive Infektion vorliegt (Kuethe et al. 2009; Schenk et al. 2009). Auf diesen Erkenntnissen aus der Literatur basierend und durch unsere Ergebnisse bestärkt, lässt sich schlussfolgern, dass der Virusnachweis in der EMB bei Patienten mit DCM keine relevante Rolle bezüglich der Prognose der Erkrankung zu spielen scheint.

Desweiteren wurde beschrieben, dass in bis zu 50% der Patienten mit DCM eine chronische myokardiale Entzündungsreaktion nachweisbar ist (Kuhl et al. 1994; Noutsias et al. 2002). Die pathophysiologische Folge einer kardialen Virusinfektion kann die Myokarditis sein. Hierbei kommt es zur Schädigung der KMs, zur Degradation kardialer EZM, zur Aktivierung von T-Zellen und Zytokinen sowie zur Antikörperbildung. Infolge des inflammatorischen myokardialen Gewebeschadens kommt es zu reparativen Fibrosierungsprozessen, welche in einer linksventrikulären Dilatation und kardialen Dysfunktion münden können. Aufgrund des umfassenden kardialen Gewebeschadens kommt es zum Bild der DCM. Die Inflammation ist neben der Fibrose auch eine histopathologische Folge der Gewebeschädigung und damit nicht nur Auslöser derselben. Sie wurde in verschiedenen Studien als prädiktiver Faktor einer schlechten Prognose bei Patienten mit DCM diskutiert (Kanzaki et al. 2001; Terasaki et al. 1999). Aufgrund der Annahme, dass die HLA-Expression im Myokard indikativ für einen chronischen autoimmunen bzw. inflammatorischen Prozess ist, wurde die HLA-Expression in unserem Patientenkollektiv neben der Infiltration des Gewebes mit entzündlichen Zellen betrachtet. Es gibt Studien, die zeigen, dass die Expression des HLA-Antigens bei akuter Myokarditis vermehrt

auftritt (Herskowitz et al. 1990) und zwischen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Erkrankungen unterscheiden kann (Wojnicz et al. 1998). Außerdem scheint die HLA-Expression der Beurteilung entzündlicher Infiltrate im Gewebe überlegen zu sein, da HLA im gesamten Myokard exprimiert wird und entzündliche Infiltrate aufgrund ihrer fokalen Verteilung dem Untersucher im Rahmen der histopathologischen Beurteilung entgehen können (Kuethe et al. 2006). Unter Berücksichtigung der Infiltration des Gewebes mit entzündlichen Zellen und der HLA-Expression kann dem Nachweis der Inflammation in Hinblick auf die Prognose in unserem Patientenkollektiv keine Bedeutung zugeschrieben werden. Ohne Zweifel ist die Inflammation jedoch als Reaktion auf eine kardiale Gewebeschädigung von besonderer Bedeutung. In den jeweils als triphasisch beschriebenen pathophysiologischen Krankheitsmodellen des Myokardinfarktes und der Myokarditis ist die Inflammation jeweils die initiale Krankheitsphase, welche im Verlauf zum kardialen *Remodelling* und zur Fibrose des Gewebes führt (Dobaczewski et al. 2010; Mason 2003). Die Vorstellungen zu den Krankheitsverläufen beim Myokardinfarkt bzw. der Myokarditis sind jedoch nur bedingt auf den Krankheitsverlauf einer DCM übertragbar. Bei der DCM ist der Erkrankungszeitpunkt oftmals nicht klar definiert. Es gibt zahlreiche unterschiedliche Ursachen für eine DCM. Nicht jede DCM beruht auf einer Inflammation. Im Gegensatz zu den klar umschriebenen zeitlichen Verläufen des Myokardinfarktes und der Myokarditis, ist der Verlauf einer DCM oftmals langwierig und schleichend. Die Kenntnisse zur Pathophysiologie der DCM basieren, nach heutigem Stand der Wissenschaft, auf Hypothesen. Der vage Einfluss der Inflammation auf den Krankheitsverlauf kann auch daran festgemacht werden, dass antiinflammatorische Interventionen bei DCM-Patienten bisher ohne signifikanten Erfolg blieben (Wight et al. 2011). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass es auch zur Fibrose kommen kann, ohne dass eine Inflammation vorgelegen hat. Dies kann der Fall sein, wenn verschiedene profibrotische Agonisten der EZM, wie TGF-beta, von nicht-inflammatorischen Zellen gebildet werden (Wynn 2008). Aus diesen Überlegungen abgeleitet, können folgende Gründe für den fehlenden signifikanten Zusammenhang zwischen der Inflammation und der Prognose des Patienten in unserem Patientenkollektiv diskutiert werden: 1) eine zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme abgeklungene Inflammation oder 2) eine im Gewebe zu keinem Zeitpunkt vorhanden gewesene Inflammation. Die Bedeutung der Rolle der Inflammation während kardialer Krankheitsprozesse muss somit Gegenstand

weiterer Untersuchungen sein. Offensichtlich gibt es jedoch Prozesse im kardialen Gewebe, die hinsichtlich der Aussage über die Prognose des Patienten der Inflammation überlegen sind.

6.1.2 Fibrose

Die Fibrose gilt neben der Inflammation als weiteres wesentliches histopathologisches Merkmal der Gewebeschädigung. In unseren Ergebnissen konnten wir jedoch keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Fibrose im Gewebe und der Prognose des Patienten aufzeigen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen vergangener Studien, in denen eine Assoziation zwischen der Fibrose sowie einzelnen Parametern der EZM und der Prognose von Patienten mit DCM beschrieben werden konnte (Assomull et al. 2006; Looi et al. 2010; Wu et al. 2008). Eine wahrscheinliche Erklärung für die Verschiedenheit der Ergebnisse könnte sein, dass die Fibrose ein Prozess ist, der sich zum einen im Gewebe spatio-temporal unterscheidet und zum anderen innerhalb einer Erkrankung stadienabhängig ist (Weber et al. 1989). Möglicherweise kann durch eine EMB die Fibrose in ihrer Gesamtheit nicht vollständig erfasst werden, da diese nur zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmte Bereiche des Myokards erfasst. Es gibt aktuelle Studien dazu, dass die kardiale Fibrose durch bildgebende Verfahren wie das MRT besser erfasst werden kann sowie Aussagen zur Prognose des Patienten erlaubt (Gulati et al. 2013; Ismail et al. 2012; Leyva et al. 2012; Masci et al. 2013; Nabeta et al. 2013). Myokardiales *Remodelling* und interstitielle Fibrose sind kennzeichnend für eine chronische Herzinsuffizienz, wobei quantitativ relevante Kollagenablagerungen überwiegend für spätere Erkrankungsstadien beschrieben sind (Milting et al. 2008; Porter & Turner 2009). So könnte eine Diskrepanz zwischen den Studienergebnissen auch dadurch zustande kommen, dass sich die untersuchten Patienten möglicherweise in unterschiedlichen Krankheitsstadien befanden und damit das Vorhandensein von Fibrose im kardialen Gewebe stark variierte.

Die Rolle der Fibrose bei DCM konnte bisher nicht genau definiert werden. Der Fibrosierungsprozess ist in seiner Funktion für das Gewebe keinesfalls als ausschließlich nachteilig zu sehen. Er reflektiert zunächst das Bestreben nach Reparatur des Gewebes zum Erhalt seiner Funktion und Integrität (Porter & Turner 2009) und beinhaltet unterscheidbare Schritte der Synthese und Degradation verschiedener Matrixproteine, welche in Folge zahlreicher Zell-EZM- und EZM-EZM

Interaktionen auftreten (Imanaka-Yoshida et al. 2004). Wann dieser Prozess beginnt und wodurch er getriggert wird, ist unklar, da oftmals nicht bekannt ist, wann die Erkrankung begonnen hat oder was die Ursachen bzw. Auslöser gewesen sind. In unserem Patientenkollektiv ist eine Fibrose zwar unumstritten vorhanden, aber sie ist noch nicht mit dem Bild einer finalen kardialen Dysfunktion assoziiert. Auf eine initiale Schädigung reagiert das Gewebe mit Reparaturprozessen in Form von kardialen *Remodelling*. Die daran beteiligten und im Fokus dieser Arbeit stehenden Komponenten ED-A⁺-Fn, B⁺ Tn-C, MMP-9, TIMP-1, FBs und MyoFBs werden vermehrt gebildet, greifen in einem zahnradartigem Prozess konkordant in die Funktionsweise des anderen ein bzw. haben eine bestmögliche Reparatur des Gewebes Schadens zum Ziel. Neben diesen permanent ablaufenden Auf- und Umbauprozessen zeigt sich vermutlich zum Zeitpunkt der EMB in unserem Patientenkollektiv zwar Fibrose mit nachfolgender Funktionseinschränkung des Gewebes, jedoch häufig noch nicht in einem schweren Ausmaß. Die konkordant vermehrte Nachweisbarkeit der Komponenten der EZM während der dynamischen *Remodelling*prozesse ist wahrscheinlich zu diesem Zeitpunkt Ausdruck eines Fließgleichgewichtes zwischen Matrixauf- und -abbau. Das Ausmaß der Nachweisbarkeit der von uns untersuchten Serum- als auch Gewebeparametern ist individuell unterschiedlich und erlaubt uns die Schlussfolgerung einer individuellen Aktivität oder Aggressivität der kardialen Umbauprozesse. So ist es zum Zeitpunkt der Untersuchung unseres Patientenkollektivs nicht die Fibrose, die eine entscheidende Aussage über den Erkrankungsprozess liefert, sondern mutmaßlich die dynamische Aktivität der Umbauprozesse im Gewebe, die wegweisend für die Prognose des Patienten ist.

6.2 Schlüsselparameter des kardialen EZM-Remodellings und ihre Bedeutung für die Prognoseabschätzung der DCM

6.2.1 Nachweis von B⁺ Tn-C im Serum und im Myokardgewebe von DCM-Patienten

Im Rahmen unserer Untersuchungen zeigten für B⁺ Tn-C sowohl die Serumkonzentration als auch das Gewebedepositionslevel eine signifikante Assoziation zur Prognose. Jene Patienten, die erhöhte Serumkonzentrationen und/oder eine vermehrte Gewebedeposition aufwiesen, starben früher verglichen mit

Patienten, die geringere, d.h. die festgelegten *Cut-off*-Wert unterschreitende Werte aufwiesen.

Es existieren einige Studien zum Nachweis von großen, wenig gespleißtem Tn-C-Varianten (insbesondere B⁺ Tn-C) im Serum von Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung (Franz et al. 2009), DCM oder akutem Myokardinfarkt (Sato et al. 2006). In einer Untersuchung von Aso et al. konnten an 31 Patienten mit DCM signifikant höhere Serumspiegel von Tn-C im Vergleich zu 20 gesunden Kontrollen und eine signifikante Korrelation zum NYHA-Stadium, der LVEF, dem linksventrikulären endsystolischen Diameter (LVESD) sowie dem BNP-Spiegel beobachtet werden (Aso et al. 2004). In einer weiteren Studie von Terasaki et al. konnte an 87 DCM-Patienten im Vergleich zu 20 gesunden Kontrollen ebenfalls eine Korrelation von Serum-Tn-C und NYHA-Stadium, BNP-Spiegel, dem LVEDD bzw. LVESD sowie der LVEF gezeigt werden (Terasaki et al. 2007). Beide Studien weisen auf den Zusammenhang zwischen Serum-Tn-C-Spiegel und der Schwere der Herzinsuffizienz, dem Ausmaß des kardialen *Remodellings* sowie der linksventrikulären Funktionsstörung hin. Aussagen zur Prognose der Patienten konnten jedoch nicht getroffen werden. Mit der Frage der prognostischen Relevanz von B⁺ Tn-C im Serum beschäftigt sich eine Arbeit von Fujimoto et al., welche an 110 DCM-Patienten darstellt, dass eine kombinierte Betrachtung von B⁺ Tn-C und BNP im Serum eine Voraussage über das Auftreten von kardialer Dekompensation bzw. Versterben der Patienten treffen kann (Fujimoto et al. 2009). Weiterhin konnte die Aussagekraft von verschiedenen EZM-Komponenten, darunter auch TIMP-1 und Tn-C im Serum als Biomarker für das Ausmaß des myokardialen *Remodellings* belegt werden. So fanden sich für Tn-C und TIMP-1 signifikant erhöhte Werte bei Patienten im Endstadium einer Herzinsuffizienz verglichen mit gesunden Probanden (Milting et al. 2008). Studien zur CRT weisen darauf hin, dass eine Behandlung, die sich positiv auf die Herzfunktion auswirkt, mit reversem kardialen Gewebeumbau verbunden ist. So konnte ein Abfall des Serum-Tn-C-Spiegels bei Patienten nach CRT-Systemimplantation nachgewiesen werden (Hessel et al. 2007).

Außerdem existieren verschiedene Untersuchungen, die die Reexpression von großen, wenig gespleißten Tn-C in Gewebeproben bei Patienten mit kardialen bzw. kardiovaskulären Erkrankungen untersucht haben. Folgende kardiovaskuläre Erkrankungen zeigten sich mit einem erhöhten Gewebespiegel von Tn-C assoziiert: Atherosklerose, die chronische Abstoßungsreaktion nach HTx, die kalzifizierende

Aortenstenose, das akute Koronarsyndrom, der Myokardinfarkt, die Myokarditis und die ischämische bzw. dilatative Kardiomyopathie (Golledge et al. 2011). Bei Patienten mit Myokarditis konnte eine signifikante Korrelation von Tn-C im Gewebe zum Grad der histologischen Schädigung in sequentiellen Biopsieentnahmen beobachtet werden. Diese Studie deutet einen Zusammenhang zwischen dem Spiegel von Tn-C und der Erkrankungsaktivität an (Morimoto et al. 2005). Eine signifikante Korrelation von u.a. ED-A⁺-Fn und A1⁺-Tn-C im Gewebe zum Grad der histologischen Gewebeschädigung konnte durch unsere Arbeitsgruppe an Patienten mit koronarer Herzerkrankung sowie Aortenklappenstenose gezeigt werden (Baldinger et al. 2011; Franz et al. 2010a). Im Tiermodell der chronischen Abstoßungsreaktion nach HTx fand sich das Auftreten von Tn-C im Gewebe mit der chronischen Rejektion assoziiert (Franz et al. 2010b; Franz et al. 2011b). Aktuell existieren keine publizierten Studien, die einen Zusammenhang zwischen Tn-C-Reexpression und der Prognose bzw. der Erkrankungsschwere von DCM-Patienten aufzeigen. Vor diesem Hintergrund kann die in dieser Arbeit dargestellte Assoziation erhöhter Serumspiegel bzw. Gewebedepositionslevel von B⁺ Tn-C zur Prognose von Patienten mit DCM und reduzierter linksventrikulärer Funktion als neuwertig betrachtet werden. Unsere Untersuchungen bekräftigen, dass sich große, wenig gespleißte Tn-C-Varianten als potenzielle Biomarker für kardiale Gewebsumbauprozesse qualifizieren und zur Überwachung von Reparaturprozessen des kardialen Gewebes und der Herzfunktion geeignet sind.

6.2.2 Die Bedeutung der Gewebedeposition von ED-A⁺-Fn bei Patienten mit DCM

Die Beteiligung von ED-A⁺-Fn an wichtigen pathologischen Gewebsumbauprozessen wie der Atherosklerose (Babaev et al. 2008; Tan et al. 2004), der Lungenfibrose (Hernnas et al. 1992; Muro et al. 2008) oder der Leberfibrose (Jarnagin et al. 1994) konnte im Tiermodell bereits ausführlich nachgewiesen werden. Zur Rolle der Expression des Glykoproteins im kardialen Gewebe beim Krankheitsbild der DCM am Menschen- sowie im Tiermodell existieren bisher wenige Daten (Gabler et al. 1996). Unsere Arbeitsgruppe konnte eine signifikante Assoziation der Gewebedeposition von ED-A⁺-Fn zum Grad der histologischen Schädigung an Patienten mit koronarer Herzerkrankung und/oder Aortenklappenstenose zeigen (Baldinger et al. 2011; Franz et al. 2010a). Daran anknüpfend belegen die hier

dargestellten Ergebnisse, dass es eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von ED-A⁺-Fn im Gewebe von Patienten mit DCM und der Prognose gibt. In einer Arbeit von Heling et al. konnte an humanem Herzgewebe von Patienten, die im Endstadium einer DCM transplantationspflichtig wurden, und einer gesunden Kontrollgruppe ein Zusammenhang zwischen ED-A⁺-Fn, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, und der Progression von Fibrose sowie zur systolischen und diastolischen Dysfunktion demonstriert werden (Heling et al. 2000). Die dort beschriebenen Befunde wurden an Gewebeproben von Patienten im Endstadium einer DCM erhoben. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals nachgewiesen werden, dass bereits viel früher eine solche Assoziation auftritt und damit möglicherweise ED-A⁺-Fn ein exzellenter Biomarker zur Identifikation des Ausmaßes der Gewebeschädigung bzw. der funktionellen kardialen Beeinträchtigung ist, welcher darüber hinaus von prognostischer Relevanz für Patienten mit DCM sein kann. Die potentielle funktionelle Bedeutung von ED-A⁺-Fn für den mit Herzerkrankungen assoziierten Gewebeumbau wird durch einige weitere Untersuchungen belegt. So wurde am Tiermodell der chronischen Abstoßungsreaktion nach HTx ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Fibrose und Transplantatvaskulopathie mit der Expression von ED-A⁺-Fn gezeigt (Booth et al. 2012; Franz et al. 2011a). Weiterhin existiert eine Studie von Faith et al., die am Tiermodell nach Herzinfarkt überzeugend darstellt, dass die Abwesenheit von ED-A⁺-Fn im Gewebe zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und des Überlebens führt (Arslan et al. 2011).

6.2.3 Die Relevanz der Nachweisbarkeit von ASMA-positiven Zellen im kardialen Gewebe bei Patienten mit DCM

Nachdem in unserer Studie eine signifikante Assoziation der EZM-Komponenten B⁺ Tn-C und ED-A⁺-Fn im Gewebe zum Überleben von DCM-Patienten gezeigt werden konnte, ergab die Betrachtung des vermehrten Auftretens von ASMA-positiven Zellen im Myokardgewebe ebenfalls eine signifikante inverse Korrelation zum Überleben. ASMA eignet sich zum Nachweis von sowohl MyoFBs als auch VSMCs (Glukhova et al. 1989; Leask 2010). Immunhistochemische Analysen an Myokardgewebe mit Zeichen der chronischen Abstoßungsreaktion nach heterotoper Ratten-HTx zeigten eine Kodelposition von ASMA-positiven Zellen, B⁺ Tn-C und ED-A⁺-Fn. Das Ausmaß der Deposition von ASMA im Gewebe zeigte eine positive Korrelation zum Grad der

chronischen Abstoßungsreaktion (Franz et al. 2010b). Der vermehrte Nachweis von ASMA-positiven Zellen im myokardialen Gewebe weist auf das vermehrte Vorhandensein von MyoFBs und VSMCs als Zeichen eines aktivierten interstitiellen (MyoFBs) und vaskulären (VSMCs) *Remodellings* hin. Da während einer DCM kardiale *Remodelling*prozesse vorwiegend im Interstitium ablaufen und vaskuläre Umbauprozesse dem untergeordnet sind, vermittelt die Darstellung ASMA-positiver Zellen größtenteils das Vorhandensein von MyoFBs. Es ist an dieser Stelle kritisch einzuräumen, dass eine Unterscheidung zwischen MyoFBs und VSMCs in der vorliegenden Studie nicht vorgenommen wurde. Eine solche wäre z.B. unter Verwendung von Koloalisationsstudien, z.B. mit Vimentin oder FSP-1 (*fibroblast specific Protein-1*) denkbar (Camelliti et al. 2004). Diese Einschränkung muß bei der Betrachtung der dargestellten Ergebnisse berücksichtigt werden. Andererseits ist eine cLSM-basierte Quantifizierung von Proteindepositionen im Gewebe unter Verwendung von Immunfluoreszenzmehrfachmarkierungen verglichen mit Einfachmarkierungen mit einer deutlich höheren Fehlerrate und Meßungenauigkeit vergesellschaftet. Trotz dieser Einschränkungen kann die signifikante inverse Korrelation ASMA-positiver Zellen zum Überleben der Patienten zumindest partiell auf den Einfluss kardialer MyoFBs auf das extrazelluläre *Remodelling* zurückgeführt werden.

6.2.4 Die Bedeutung der Bestimmung von MMP-9 und TIMP-1 im Serum von Patienten mit DCM

In der vorgelegten Arbeit haben wir weiterhin die Serumkonzentration von MMP-9 und TIMP-1 untersucht. Wir konnten zeigen, dass erhöhte MMP-9- als auch TIMP-1-Spiegel mit einer verminderten Überlebenszeit des Patienten und damit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Nach CRT als therapeutische Option bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz konnte, verglichen mit der prätherapeutischen Konzentration, eine signifikante Verminderung des Serumspiegels von MMP-9 nachgewiesen werden (Hessel et al. 2007). Diese Ergebnisse bestätigen indirekt unsere Befunde, wonach eine signifikante Assoziation zwischen Serum-MMP-9-Spiegel und der linksventrikulären Funktion zu bestehen scheint. Zu unserer besten Kenntnis existieren bisher keine Untersuchungen zur Relevanz von TIMP-1 und MMP-9 als Biomarker zur Prognoseabschätzung von DCM-Patienten. Es existieren jedoch Studien zur Relevanz von MMP-9 und TIMP-1

für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen (Chancey et al. 2002; Fielitz et al. 2004; Franz et al. 2009; Heymans et al. 2005). Die Mehrheit der Studien zur DCM bzw. Herzinsuffizienz wurde an Myokardgewebe, nicht an Serum, durchgeführt. Eine vermehrte Gewebeexpression von MMP-9 im Vergleich zu gesunden Kontrollen und im Vergleich zu anderen Kardiomyopathien konnte vielfach nachgewiesen werden (Gunja-Smith et al. 1996; Herpel et al. 2006; Rouet-Benzineb et al. 1999; Spinale et al. 2000b; Thomas et al. 1998). Eine Veröffentlichung von Sundström et al. im Rahmen der *Framingham* -Herzstudie konnte belegen, dass erhöhte Plasmaspiegel von MMP-9 und auch TIMP-1 mit einem signifikant erhöhten Risiko für defizitäres linksventrikuläres *Remodelling* verbunden sind (Sundstrom et al. 2004a; Sundstrom et al. 2004b). Wie auch in unserer Studie, konnten Thomas et al. an DCM-Patienten ebenfalls eine konkordante Expression von TIMP-1 und MMP-9 zeigen (Thomas et al. 1998). Dieser Zusammenhang scheint bemerkenswert, da TIMP-1 einen endogenen Inhibitor von MMP-9 darstellt. In der Literatur gibt es jedoch zur Expression von TIMP-1 gegensätzliche Ergebnisse. Während verschiedene MMP- Subtypen im Rahmen der DCM vermehrt exprimiert werden, konnten für TIMPs für dieses Krankheitsbild in einigen Untersuchungen auch erniedrigte Spiegel nachgewiesen werden (Li et al. 1998; Li et al. 2001; Rouet-Benzineb et al. 1999). Eine Studie von Li et al. stellte heraus, dass TIMP-1 und MMP-9 Spiegel gegensätzlich reguliert werden, also eine *downregulation* von TIMP-1 mit einer *upregulation* von MMP-9 einhergeht (Li et al. 1998). In einer Studie von Spinale et al. konnte jedoch auch demonstriert werden, dass bei Patienten mit einer DCM erhöhte MMP-9 Spiegel ohne gleichzeitigen Anstieg von TIMP-1 auftreten, wodurch das MMP-9/TIMP-1 Verhältnis erhöht wird. In der Folge könnte es zu einem Überwiegen der proteolytischen Aktivität von MMP und einer Abnahme von MMP-9/TIMP-1 –Komplexen während des kardialen *Remodellings* kommen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Verhältnis von MMP zu TIMP stadienabhängig differentiell reguliert zu sein scheint und somit von besonderer Bedeutung für das kardiale *Remodelling* ist (Spinale et al. 2000b).

Bei der Interpretation der beschriebenen DCM-Studien müssen einige methodische Detailspekte gewürdigt werden, um die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit adäquat einordnen zu können. Der Zeitpunkt der Gewebe- bzw. Serumentnahme ist in den meisten Fällen der Zeitpunkt vor HTx und stellt damit den Zustand des myokardialen Gewebes im Endstadium der Erkrankung dar. Eine kausale Beziehung

zwischen pathologischem linksventrikulären *Remodelling* und erhöhten Serumspiegeln von MMP-9 und TIMP-1 kann anhand dessen nicht abgeleitet werden. Vor dem Hintergrund bisheriger Studien könnte man somit der Annahme unterliegen, dass konkordant erhöhte Serumspiegel von TIMP-1 und MMP-9, bzw. erhöhte Serumspiegel von MMP-9 und verminderte von TIMP-1, auf das Endstadium einer Herzerkrankung hinweisen bzw. indikativ dafür sind. Es gibt Darstellungen in der Literatur, die zeigen, dass ein erhöhter MMP-9 Spiegel im Endstadium einer Herzerkrankung bzw. bei verschiedenen Formen der Kardiomyopathie unabhängig von der zu Grunde liegenden Ursache auftritt (Herpel et al. 2006; Reinhardt et al. 2002). Studien zum Effekt linksventrikulärer *Assistsysteme*, die MMP-9 und TIMP-1 bzw. das Verhältnis MMP-1/TIMP-1 zum Zeitpunkt der Implantation und zur Monate später stattfindenden Explantation darstellen, zeigen nach Explantation des *Assistsystems* eine verminderte Expression von MMP-9 bzw. vermehrte Expression von TIMP-1 oder ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von MMP-1 zu TIMP-1 (Klotz et al. 2005; Li et al. 2001). Parallel dazu stellten beide Studien sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Verbesserung des linken Ventrikels fest. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Gewebe- bzw. Serumproben eines jeden Patienten zu genau einem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf der DCM, zum Zeitpunkt der EMB und Diagnosestellung der DCM entnommen. Die hier beschriebenen erhöhten Serumspiegel beider Biomarker könnten das Korrelat vermehrt ablaufender Umbauprozesse der kardialen EZM darstellen, und dies bereits in frühen Stadien der Erkrankung. Der so reflektierte vermehrte *turnover* der kardialen EZM ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose der Patienten. Damit kann postuliert werden, dass eine vermehrte Expressionen von TIMP-1 und MMP-9 bereits früh im Krankheitsverlauf Aussagen zur Risikostratifizierung erlauben.

Zu unserer besten Kenntnis existieren bisher keine Studien, die die Serumkonzentration von MMP-9 und TIMP-1, die Serum- und Gewebelevel von B⁺ Tn-C, die Gewebedeposition von ED-A⁺-Fn und die Anzahl der MyoFBs und aktivierten VSMCs im kardialen Gewebe, gemessen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, in Beziehung zur Prognose von DCM-Patienten beleuchten. Weiterhin existieren keine Analysen, welche alle Parameter innerhalb einer Patientengruppe und einer Erkrankungsentität zusammenschauend beschreiben. Aus diesen Gründen ist es nicht trivial, unsere Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen, die mehrheitlich auf wesentlich kleineren Patientengruppen mit einer

höhergradigen linksventrikulären Dysfunktion basieren. In der Regel stammen die Ergebnisse der bisherigen Studien von Patienten, die kurz vor einer HTx standen. Deshalb sind zum Beispiel die unterschiedlichen Befunde hinsichtlich der TIMP-1-Serumspiegel im Vergleich zu unseren Ergebnissen mit Vorsicht zu diskutieren. Eine verminderte Expression von TIMP-1 in späteren Erkrankungsstadien legt die Vermutung nahe, dass zu diesem Zeitpunkt eine Betonung der proteolytischen Aktivität von MMP, eine verstärkte Degradation fibrillären Kollagens, ein vermehrter Myozytenverlust und infolge dessen eine stärkere Einschränkung der linksventrikulären Funktion in den Vordergrund tritt, sich also das System des kardialen *Remodelling*prozesses hin zum Matrixabbau verschiebt. Man könnte mutmaßen, dass die Serumparmater von TIMP-1 bei unseren Patienten im Verlauf sinken werden. Bisher existieren jedoch keine Verlaufsuntersuchungen zur Expression von MMP-9 und TIMP-1 im zeitlichen Krankheitsverlauf der DCM. In einer tierexperimentellen Untersuchung an Schweinen konnte Spinale et al. anhand serieller Messungen von MMP bei induzierter Herzinsuffizienz nachweisen, dass es bereits in frühen Erkrankungsstadien zur vermehrten MMP-Expression bzw. im Verlauf zu einem weiteren MMP-Anstieg kommt (Spinale et al. 1998). Weiterhin ist bislang unklar, ob die Spiegel von MMP als auch TIMP wirklich repräsentativ für deren Vorhandensein im kardialen Gewebe sind. Indem wir die Serumspiegel beider Biomarker im Zusammenhang mit der linksventrikulären Dysfunktion sehen, gehen wir davon aus, dass zirkulierende MMPs und TIMPs aus dem Herzen stammen und berücksichtigen dabei nicht, dass MMP-9 beispielsweise auch ein Marker für vaskuläre *Remodelling*prozesse sein kann (Blankenberg et al. 2003; Joffs et al. 2001). Eine Studie von Lalu et al. konnte allerdings äquivalente Veränderungen von MMP-2 und MMP-9 in Gewebe und Serum von Patienten, die sich einer Herzoperation unterzogen, demonstrieren (Lalu et al. 2005). Weiterhin reflektieren die gemessenen Plasmaspiegel nicht die proteolytische Aktivität von MMP und TIMP. MMPs zirkulieren nicht frei in der Blutbahn, sondern formen Komplexe mit Proteinen wie Albumin oder γ -Makroglobulin (Nagase et al. 2006) bzw. TIMP oder zirkulieren als Proformen. Im Vergleich verschiedener Studien kann dieser Aspekt zu Missverständnissen führen. Studien mit seriellen Messungen der Plasmaspiegel könnten zu einer größeren Meßgenauigkeit beitragen und die beschriebenen Einschränkungen der Einmalmessungen überwinden. Es gibt außerdem Untersuchungen dazu, dass Serumspiegel von MMP und TIMP durch Einflussgrößen

wie Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft, aber auch Diabetes, Dyslipidämie und Rauchen beeinflusst werden können (Ebihara et al. 1998; Janicki et al. 2004; Nakamura et al. 1998; Noji et al. 2001; Potier et al. 2003; Tayebjee et al. 2005). Deshalb ist es wichtig, in folgenden Studien Referenzwerte für diese Biomarker zu entwickeln. Wesentlich zu einer hinsichtlich der Prognose des Patienten klinisch verwendbaren Messung der Serumparameter würden ebenfalls Grenzwerte beitragen, die einen prognostisch günstigen von einem prognostisch ungünstigen Verlauf trennen können. In der Beurteilung der unterschiedlichen Studienergebnisse muss auch beachtet werden, dass wir nicht das gesamte MMP- bzw. TIMP- System betrachten, welches mit seinen 25 bzw. 4 verschiedenen Isoformen äußerst komplex ist. In dieser Arbeit wurde MMP-9 bzw. TIMP-1 ausgewählt, weil in verschiedenen Studien eine signifikante Korrelation zum linksventrikulären *Remodelling* aufgezeigt werden konnte, obgleich dieser Ansatz in sich birgt, dass andere Metalloproteinasen oder deren Inhibitoren nicht berücksichtigt werden. Auch wenn man sich nun dieser differenzierten Beurteilung der Ergebnisse, die MMP-9 und TIMP-1 im Serum liefern können, stellt, bleiben beide Serumparameter sehr vielversprechende prognostische Biomarker der linksventrikulären Dysfunktion. Aufgrund der leichteren Zugänglichkeit von Serum im Vergleich zur Herzmuskelbiopsie eröffnen diese Marker neue Perspektiven in der Herzinsuffizienzforschung.

6.3 Synopsis der Befunde: Hypothetische Betrachtungen zur Zell-Matrix-Interaktion der untersuchten Biomarker mit aktivierten Fibroblasten

In unserer Studie konnten wir die prognostische Relevanz der für das myokardiale *Remodelling* wesentlichen extrazellulären Matrixkomponenten B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9 und TIMP-1 sowie ASMA-positiven Zellen, d.h. MyoFBs und VSMCs darstellen. In den letzten Jahren ist das Interesse an der EZM und ihren Komponenten stetig gestiegen, eben weil für einzelne Komponenten eine krankheitsspezifische Expressionsänderung mit funktioneller Relevanz gezeigt werden konnte. Deshalb sind verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9 und TIMP-1 sowohl im humanen System als auch Tiermodell erfolgt. Eine Vielzahl von in der Literatur verfügbaren Daten bestätigt enge funktionelle Wechselwirkungen der hier untersuchten EZM-Komponenten sowohl untereinander als auch mit zellulären Komponenten, dann im Sinne der sog. Zell-EZM-Interaktionen. Eine vereinfachte schematische Übersicht zu Grundprinzipien

dieses komplexen Interaktionsgefüges gibt **Abbildung 21**. Die enge Wechselwirkung zwischen großen, wenig gespleißten Tn-C und MyoFBs wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Berndt et al. 1994). Tn-C trägt zur Rekrutierung von MyoFBs bei (Imanaka-Yoshida et al. 2001; Imanaka-Yoshida et al. 2004; Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies 1980; Tamaoki et al. 2005). MyoFBs synthetisieren neben anderen EZM-Komponenten auch Tn-C (Hanamura et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Imanaka-Yoshida weist in einer Untersuchung aus dem Jahre 2004 darauf hin, dass Tn-C in verschiedenen Zelltypen die Transkription und Aktivierung von MMPs induzieren kann (Jian et al. 2001; Tremble et al. 1994). Es ist darüber hinaus beschrieben, dass Tn-C auch während des pathologischen kardialen *Remodellings* die Expression von MMPs induziert und damit eine Degradation der Verbindung von KMs mit der sie umgebende EZM bewirkt (Imanaka-Yoshida et al. 2004).

Unter anderem ist MMP-9 wiederum in der Lage, sowohl Tn-C als auch ED-A⁺-Fn zu spalten (Spinale 2007; Zamilpa et al. 2010). ED-A⁺-Fn induziert, vermittelt durch TNF- \uparrow 1, die Differenzierung von FBs in ASMA-exprimierende MyoFBs (Kohan et al. 2010; Serini et al. 1998). MyoFBs tragen zu ihrem eigenen Überleben durch Sekretion von TGF- \uparrow im Sinne eines autokrinen *Loops* bei (Wight & Potter-Perigo 2011). Eine erhöhte Synthese und Sekretion von Fn konnte nach der Transdifferenzierung von FBs zu MyoFBs beobachtet werden (Gabbiani 2003). Neben der Transdifferenzierung von kardialen FBs zu MyoFBs bewirkt TGF-beta1 eine vermehrte Kollagenexpression (Petrov et al. 2002). MyoFBs induzieren die Synthese von ED-A⁺-Fn während des Geweberemodellings bei Wundheilungsprozessen und fibroseassoziierten Erkrankungen (Berndt et al. 1994; Kosmehl et al. 1996). Außerdem tragen MyoFBs aktiv zum kardialen *Remodelling* bei, indem sie zur Stimulation der Sekretion der EZM-degradierenden MMPs und zu einem erhöhten Kollagenumsatz führen (Brown et al. 2005; Camelliti et al. 2005; Weber 2004). Die Funktion von TIMP-1 ist zum einen die Inhibition von MMP-9. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, dass TIMP-1 das Zellwachstum in einer Reihe von Zelltypen induzieren, als auch antiapoptotische Effekte durch Induktion entsprechender Gene ausüben kann. Diese antiapoptotischen bzw. wachstumsfördernden Einflüsse üben TIMPs offenbar unabhängig von ihren inhibitorischen Effekten auf MMPs aus. Die Arbeitsgruppe um Lovelock konnte die verschiedenen Effekte von TIMPs auf das Wachstum und die Synthese myokardialer FBs demonstrieren. Alle TIMP-Isoformen, bis auf TIMP-3,

scheinen die Differenzierung kardialer FBs zu MyoFBs zu stimulieren (Lovelock et al. 2005).

Im Zentrum der beschriebenen Zusammenhänge steht der kardiale FB, der die Bildung von Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMPs und Kollagen induziert bzw. zur Differenzierung zum MyoFBs fähig ist (Eghbali 1992; Fan et al. 2012). Diese Zusammenhänge beschreiben eindrücklich, wie komplex die von uns untersuchten Parameter miteinander vernetzt sind. Kardiale FBs produzieren strukturelle als auch regulatorische Proteine der EZM. Sie werden jedoch auch reziprok durch diese EZM-Komponenten beeinflusst im Sinne eines sich selbst regulierenden Systems. Außerdem existieren diese reziproken Zusammenhänge zwischen ED-A⁺-Fn und MyoFBs, Tn-C und MyoFBs sowie zwischen MMP-9 und Tn-C. In einer Tier- bzw. *in-vitro* Studie am Mausmodell bzw. an Mamma-Carcinomzellen von Kalembeiy et al. konnte ein Zusammenhang zwischen der Koexpression von Tn-C und MMP während des pathologischen Geweberemodellings identifiziert werden. Tn-C induziert direkt die MMP-9-Expression im Zusammenspiel mit TGF-beta1 (Kalembeiy et al. 2003). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Koexpression von Tn-C und ED-A⁺-Fn (Hanamura et al. 1997; Ramos et al. 1998; Yoshida et al. 1997), Tn-C und MMP-9 (Cowan et al. 1999; Hessel et al. 2007; Jian et al. 2001; Streuli 1999) sowie von Tn-C , ED-A⁺-Fn und ASMA -positiven Zellen (Franz et al. 2010b). Tn-C und Fn werden gelegentlich während Herzerkrankungen und Tumorangiogenese simultan exprimiert, was möglicherweise auf ein Zusammenspiel anti-adhäsiver Eigenschaften von Tn-C mit adhäsiven Eigenschaften von Fn während des pathologischen Geweberemodellings hinweist (Van Obberghen-Schilling et al. 2011). Anhand unserer Untersuchungsergebnisse an Patienten mit DCM und den bisher beschriebenen Zusammenhängen für Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9, TIMP-1, FBs und MyoFBs läßt sich für den Prozess des kardialen Remodellings eine hypothetische, konzertierte Interaktion ableiten. Reziproke Zusammenhänge und autokrine Loops, mit deren Hilfe aktivierte FBs ihren Phänotyp selbst aufrecht erhalten können, vermitteln außerdem den Eindruck, dass die Prozesse des kardialen Remodellings, einmal in Gang gesetzt, auch unabhängig von externen oder internen Stimuli ablaufen können. Selbstverständlich sind diese Betrachtungen in ihrer Bedeutung für

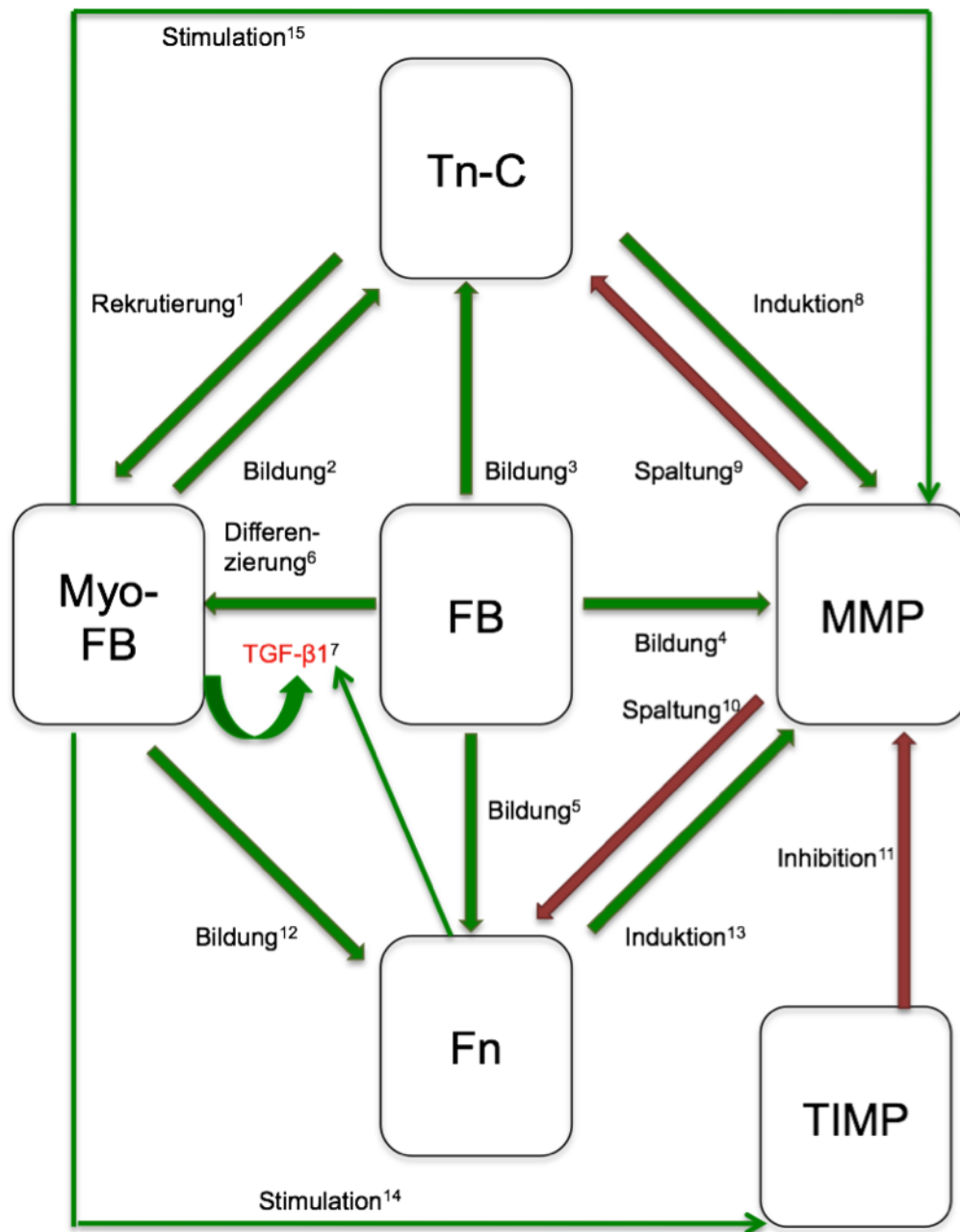


Abb.21

FB=Fibroblasten, MyoFB=Myofibroblasten, Tn=Tenascin, Fn=Fibronectin, MMP=Matrixmetalloproteinase, TIMP=Inhibitor der Matrixmetalloproteinase, rote Pfeile bedeuten Spaltung oder Inhibition, grüne Pfeile bedeuten Bildung, Stimulation oder Inhibition

¹ Tn trägt zur Rekrutierung von MyoFB bei. ² MyoFBs synthetisieren u.a. Tn. ^{3,4,5} FBs sind zur Bildung von Fn, Tn-C und MMP befähigt. ⁶ Fn vermittelt durch TNF- \downarrow 1 die Differenzierung von FBs zu MyoFBs. ⁷ Sekretion von TNF- \downarrow im Sinne eines autokrinen Loops. ⁸ Tn induziert die Aktivität, Expression und Transkription von MMPs. ^{9,10} MMPs spalten Fn als Tn-C. ¹¹ TIMP inhibiert MMP. ¹² MyoFB induzieren die Synthese von Fn. ¹³ TIMPs stimulieren die Differenzierung von FBs zu MyoFBs. ¹⁴ Fn induziert die Bildung von MMPs. ¹⁵ Stimulation der Sekretion von MMP.

kardiale *Remodelling*prozesse aktuell als hypothetisch einzuordnen, da einige der genannten Interaktionen bisher nur in vitro, am Tiermodell oder am Modell eines anderen Gewebes als Herzgewebe beschrieben worden sind. Eine weitere Einschränkung dieser Darstellung besteht darin, dass nicht alle Parameter aus dem gleichen Untersuchungsmedium stammen. MMP-9 und TIMP-1 stellen Serumparameter dar. ED-A⁺-Fn und ASMA-positive Zellen wurden nur im Gewebe und Tn-C wurde im Serum als auch im Gewebe untersucht. Ein Nachweis von ED-A⁺-Fn im Serum wäre aus unserer Sicht sehr interessant gewesen, da ED-A⁺-Fn ein vielversprechender diagnostischen Marker zu sein scheint. Bisher ist jedoch kein kommerziell verfügbarer ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) zur quantitativen Bestimmung von ED-A⁺-Fn in Serum oder Plasma vorhanden. Fibrosierungs- und Wundheilungsprozesse sind sehr komplex und verlaufen in jedem Gewebe in unterschiedlicher Weise und zu einem unterschiedlichen Zweck. Auch die daran beteiligten Komponenten wie die der EZM, die FBs sowie die verschiedenen weiteren Zellen eines Gewebeverbandes sind unterschiedlich und weisen verschiedene Eigenschaften auf. Letztlich sind auch die Mediatoren dieser Prozesse teilweise gewebspezifisch. Die grundlegenden Prozesse des Geweberemodellings laufen jedoch gewebeunabhängig gleichsinnig ab. Es bleibt zu überprüfen, ob die durch uns herausgestellten und auf kardiale Prozesse übertragenen Interaktionen auch auf andere Gewebearten anwendbar sind. B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9, TIMP-1, FBs und MyoFBs sind nicht herzspezifisch. Das MMP/TIMP-System ist neben kardiovaskulären Erkrankungen an einer Reihe von pathologischen Prozessen wie Tumorerkrankungen und inflammatorischen Prozessen beteiligt (Spinale 2007).

ED-A⁺-Fn wird u.a. während der Wundheilung, fibrotischen und tumorösen Gewebsveränderungen sowie in Assoziation zur Angiogenese reexprimiert (Astrof et al. 2009; Nicolo et al. 1990; Schwarzbauer 1991; Zardi et al. 1987). Eine Reexpression von Tn-C tritt vor allem in sich im Umbau befindlichen Geweben auf, zum Beispiel während inflammatorischer Prozesse, der Wundheilung und Karzinogenese (Chiquet-Ehrismann 1995; Chuong et al. 1991). Sie könnten demzufolge auf ähnliche Weise in anderen Gewebearten interagieren. Dass wir unsere Untersuchungsergebnisse als mit der kardialen Erkrankung assoziiert betrachten können, begründet sich zum einen darin, dass unsere Patienten einem Kollektiv von DCM-Patienten entstammen, in dem es keine Hinweise auf fibroseassoziierte oder tumoröse Begleiterkrankungen gab. Außerdem haben wir uns in unserer Studie auf die Untersuchung von ED-A⁺-Fn,

B⁺ Tn-C, MMP-9, TIMP-1 und ASMA-positiven Zellen konzentriert, weil es in der Literatur vielversprechende deskriptive Analysen der einzelnen Parameter zur Bedeutung für verschiedene Herzerkrankungen gibt. Die kardiale Reexpression von ED-A⁺-Fn und B⁺ Tn-C ist für pathologische kardiale Gewebsumbauprozesse indikativ (Aso et al. 2004; Bowers et al. 2010; Terasaki et al. 2007). MMP-9 konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz als nützlicher Serummarker zur Überwachung des myokardialen EZM-*Remodellings* mit prognostischer Relevanz herausgestellt werden (Sundstrom et al. 2004a; Yan et al. 2006). TIMP-1 ist neben TIMP-2 am besten untersucht, bindet bevorzugt an MMP-9, spielt bei kardialen Gewebsumbauprozessen eine herausragende Rolle (Nagase 1997 ; Sundstrom et al. 2004b; Lovelock et al. 2005). ASMA ist ein Markermolekül von MyoFBs (Franz et al. 2010b; Leask 2010). Der Nachweis der im Zentrum kardialer *Remodelling*prozesse stehenden MyoFBs ist ein sicheres Zeichen kardialer Gewebeschädigung, da diese in gesundem Herzgewebe nicht gefunden werden (Krenning et al. 2010; Souders et al. 2009).

Interessanterweise konnten wir im Myokardgewebe von DCM-Patienten eine gesteigerte Expression von ED-A⁺-Fn, B⁺ Tn-C, MMP-9, TIMP-1 und ASMA-positiven Zellen mit signifikanter Assoziation zum Überleben des Patienten nachweisen. Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Arbeit ist dabei, dass alle Parameter zu einem bestimmten Zeitpunkt im Krankheitsverlauf der DCM, nicht jedoch erst kurz vor HTx, wie in der Mehrheit der bisherigen Studien am Menschen, untersucht worden sind, so dass nun davon ausgegangen werden kann, dass eine Erhöhung der Parameter bereits früh im Krankheitsverlauf eine schlechtere Prognose des Patienten anzeigen kann. Unserer Meinung nach spiegelt die vermehrte Nachweisbarkeit der unterschiedlichen Biomarker die Intensität der *Remodelling*prozesse der kardialen EZM wieder. Folglich weisen intensiv ablaufende *Remodelling*prozesse bereits früh im Krankheitsstadium auf eine schlechtere Prognose des DCM-Patienten hin. Warum dies so ist oder bei welchem Patienten die kardialen *Remodelling*prozesse individuell intensiv oder weniger intensiv ablaufen, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Es fehlen Verlaufsuntersuchungen, die den dynamischen Prozess des *Remodellings* der kardialen EZM beschreiben könnten. Ein wesentliches Problem bei dieser Überlegung ist, dass oftmals unklar bleibt, zu welchem Zeitpunkt eine DCM begonnen hat, da die Ätiologie der Erkrankung so heterogen ist. Die Patienten stellen sich oft erst dann vor, wenn ihre Erkrankung symptomatisch geworden ist. Das

bedeutet unter Umständen auch, dass wesentliche *Remodelling*prozesse am Herzen bereits erfolgt oder in vollem Gange sind. Eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte EMB im Rahmen der initialen Invasiv-Diagnostik liefert uns einen Einblick in die Vorgänge im Gewebe. Unklar bleibt, wie sich das Gewebe Monate später im Krankheitsverlauf darstellen wird, da keine seriellen Biopsien vorgenommen werden. Die Etablierung von validen, spezifischen und sensitiven Serumparametern könnte hierbei ein enormen Gewinn für das klinische Management von DCM-Patienten sein.

6.4 Perspektive: Implikationen der untersuchten Parameter für Diagnostik und Therapie der DCM

Durch ihre gesteigerte Expression, spatio-temporale Verteilung im Gewebe und damit individuelle Beteiligung an kardialen *Remodelling*prozessen, eignen sich die von uns untersuchten Parameter 1) als Biomarker, um zum einen frühzeitig im Krankheitsverlauf ein Bild über die dynamische Aktivität ablaufender kardialer *Remodelling*prozesse zu erhalten und zum anderen, um bereits in frühen Stadien der Erkrankung eine Aussage über die Prognose treffen zu können; und 2) als therapeutisches Target, um direkt in die für die Gewebeschädigung verantwortlichen Prozesse des pathologischen kardialen *Remodellings* einzugreifen.

Im klinischen Alltag geben uns das NYHA-Stadium und die LVEF Auskunft über die linksventrikuläre Funktionsstörung und somit über die Erkrankungsschwere und die Prognose des Patienten. Aus diesen deskriptiven Parametern der Herzfunktion lassen sich sowohl therapeutische Optionen ableiten als auch Verlaufskontrollen im Sinne der Beurteilung der Therapieeffizienz durchführen. Beide Parameter liefern uns indirekt ein Bild über die kardiale Gewebeschädigung. Basierend auf der genannten klinischen Einschätzung der Erkrankungsschwere steht bisher neben einer symptomatischen Therapie eine medikamentöse Therapie, von der man sich positive Effekte auf den Krankheitsverlauf verspricht. Diese umfasst die Gabe von ACE-Hemmern, beta-Blockern, Diuretika, Aldosteronantagonisten, Herzglykosiden und Antikoagulanzen. Durch wesentliche Studien zur Wirksamkeit von Aldosteronantagonisten zur Behandlung der Herzinsuffizienz, wie die EPHESUS-Studie (*Eplerone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) und die RALES-Studie (*Randomized Aldactone Evaluation Studie*), konnte deren Einfluss auf kardiale *Remodelling*prozesse und auf das Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Markowitz et al. 2012; Pitt et al. 2003; Pitt et al.

1999). Durch die medikamentöse Therapie mit Aldosteronantagonisten werden Morbidität und Mortalität von Patienten mit sowohl fortgeschrittener als auch milder Herzinsuffizienz reduziert (Iraqi et al. 2009; Zannad et al. 2000; Zannad et al. 2011). In *in-vivo* und *in-vitro* Studien konnte ein fördernder Einfluss von Aldosteron auf die kardiale Fibrose gezeigt werden (Fullerton et al. 1994; MacFadyen et al. 1997; Weber 1999). Die Wirksamkeit von Aldosteronantagonisten setzt an Um- und Abbauprozessen von Kollagen an. Aldosteron stimuliert als Endprodukt einer neurohormonellen Kaskade, dem Renin-Angiotensin-System (RAS), die kardiale Kollagensynthese und Fibroblastenproliferation durch die Aktivierung von Mineralkortikoidrezeptoren in Myozyten und FBs und hat damit Einfluss auf das myokardiale *EZM-Remodelling* (Catena et al. 2012; Lombes et al. 1995; Markowitz et al. 2012). Für den im Zentrum kardialer Umbauprozesse stehenden kardialen FB existieren jedoch neben dem RAS-System noch andere Stimuli, die das kardiale *Remodelling* begünstigen können, weshalb eine Therapie der Herzinsuffizienz mit Aldosteronantagonisten oder ACE-Hemmern zwar wirksam, jedoch im Hinblick auf die Einflussnahme auf kardiale Remodellingprozesse eine bedingt zielgerichtete zu sein scheint. Zu diesen Einflussfaktoren gehören: mechanische Belastung (Gupta et al. 2006; MacKenna et al. 2000), Hypoxie (Chen et al. 2004; Grobe et al. 2007; Makino et al. 2006), neurohormonelle Stimuli (Porter & Turner 2009), vasoaktive Peptide (D'Souza et al. 2004), Adenosine (Villarreal et al. 2003) und Zytokine (Eghbali et al. 1991; Villarreal et al. 1996; Heimer et al. 1995). Die Wirksamkeit von Aldosteronantagonisten oder ACE-Hemmern in der Herzinsuffizienztherapie könnte auch darauf beruhen, dass MyoFBs in der Lage sind, Renin, ACE, Angiotensin II sowie Angiotensinrezeptoren zu exprimieren (de Haas et al. 2012). Bezüglich einer Langzeittherapie mit ACE-Hemmern gibt es Untersuchungen, dass deren Wirkung teilweise nachlässt (*aldosterone escape*) (Borghi et al. 1993). Neben ACE-Hemmern und Angiotensin-Rezeptor-Blockern haben beta-Blocker (Bristow 2000; Grimm et al. 2001; Lechat et al. 1998; Lotze et al. 2002) und Statine (Tsouli et al. 2008) ebenfalls einen Einfluss auf das myokardiale *Remodelling*. Dieser ist jedoch noch nicht vollständig verstanden und muss deshalb Inhalt zukünftiger Forschung bleiben (Porter & Turner 2009). Patienten mit DCM zeigen zudem erhöhte TGF-beta-Spiegel (Pauschinger et al. 1999). In einer Studie an DCM-Patienten zum therapeutischen Effekt von links-ventrikulären Assistsystemen zeigten die Patienten mit einem erhöhten TGF-beta-Spiegel einen signifikant geringeren Grad der Besserung (Felkin

et al. 2009). TGF-beta-Spiegel korrelieren mit der Entwicklung einer Fibrose (Hein et al. 2003) und scheinen ein Marker myokardialen *Remodellings* zu sein (Villar et al. 2009), weswegen dieser ein vielversprechender Anknüpfungspunkt für therapeutische Strategien zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein scheint (Leask 2010). Die Übertragung der vielversprechenden Studienergebnisse zum therapeutischen Effekt von TGF-beta in Tierstudien bzw. in vitro-Studien (Hermida et al. 2009; Kuwahara et al. 2002; Tan et al. 2010) auf den Menschen ist jedoch aufgrund des hohen Wirkungsspektrums von TGF-beta schwierig und zeigt bisher unerwünschte Effekte auf das kardiovaskuläre System und andere Organe. Aus diesem Grund kann der therapeutische Effekt einer TGF-beta-Blockade klinisch aktuell noch nicht genutzt werden und muß Inhalt zukünftiger Forschung bleiben (Dobaczewski et al. 2011). Der kardiale FB als auch der MyoFB stehen im Zentrum des pathologischen kardialen *Remodellings* bzw. der Fibrose. Eine FB- bzw. MyoFB-spezifische therapeutische Intervention scheint vielversprechend, konnte jedoch aufgrund der Komplexität ihrer Bildung, Interaktionen, Funktionen sowie aufgrund der Heterogenität des FB-Phänotyps bisher noch nicht umgesetzt werden (Zeisberg & Kalluri 2013). FBs bilden verschiedene Phänotypen und proliferative Fähigkeiten mit verschiedenem Alter heraus und es wird angenommen, dass FBs zu einer Differenzierung über verschiedene phänotypische Stadien ähnlich Knochenmarkszellen fähig sind (Bayreuther et al. 1988). Der Phänotyp von FBs unterscheidet sich nicht nur zwischen den einzelnen Organen, sondern auch innerhalb eines Organs. So sind einige FB der Fibroblastenpopulation des Herzens Teil des Reizleitungssystems (Camelliti et al. 2006). Der MyoFB entsteht während der Wundheilung und Fibrosierungsprozessen durch Aktivierung und Proliferation aus residenten FB. Eine Bildung aus von Knochenmark abstammenden Fibrozyten, Epithelzellen im Rahmen der EMT, VSMCs, Perizyten und EndZ im Rahmen der EndMT wurde ebenfalls beschrieben (Zeisberg et al. 2007; Zeisberg & Kalluri 2013). Das Verhalten und die Herkunft des kardialen FB/ MyoFB während kardialer Umbau- und Fibrosierungsprozesse scheint vielgestaltig, weshalb eine therapeutische Intervention auf dieser Ebene noch Inhalt zukünftiger Studien bleiben muß.

Ein therapeutischer Zugriff direkt auf kardiale *Remodelling*prozesse scheint jedoch vielversprechend und, wie bisherige Studien auch zeigten, sinnvoll. Der therapeutische Ansatz, der durch direkte Beeinflussung der EZM-Komponenten B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9, TIMP-1 und dem MyoFB entsteht, ist dem FB

„nachgeschaltet“ und entzieht sich somit den beschriebenen vielseitigen Einflussgrößen auf ihn. Wir konnten in unseren Ergebnissen zeigen, dass eine Erhöhung der EZM-Komponenten B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn, MMP-9, TIMP-1 sowie ASMA-positive Zellen signifikant mit dem Überleben der Patienten korreliert und ein Ausdruck aggressiv oder weniger aggressiv ablaufender kardialer *Remodelling*prozesse zu sein scheint. Eine therapeutische Intervention auf dieser Ebene könnte grundlegend in den Krankheitsprozess der DCM eingreifen. Mit der Einführung humaner rekombinanter Antikörper mit Spezifität gegen ED-A⁺-Fn und verschiedenen Tn-C-Varianten wurden Werkzeuge für den antikörpervermittelten, zielgerichteten Transfer von diagnostischen und therapeutischen Substanzen für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen geschaffen. Für diesen innovativen diagnostischen und therapeutischen Ansatz konnten bereits gute Erfolge bei Tumorerkrankungen und auch bei chronischen Entzündungen der Haut oder zur Behandlung experimentell induzierter Arthritis genutzt werden (Borsi et al. 2003; Schliemann et al. 2010; Trachsel et al. 2006). ED-A⁺-Fn konnte besonders in den Bereichen der Gefäßneubildung bei Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. Es eignet sich somit aufgrund der guten Erreichbarkeit über den Blutstrom besonders für die antikörperbasierte Therapie (Rybak et al. 2007). Durch eine lokale Akkumulation von antiinflammatorischen oder antiproliferativen Substanzen direkt in der erkrankten Organregion können die Wirkpotenz des Medikamentes erhöht und die systemischen Nebenwirkungen verringert werden. Vor diesem Hintergrund scheinen solche neuen Optionen der nicht-invasiven Therapie und Diagnostik von besonderer Bedeutung auch für kardiovaskuläre Erkrankungen zu sein (Casi et al. 2012; Franz et al. 2012). Aufgrund ihrer bedeutsamen Rolle während kardialer *Remodelling*prozesse wurden auch Wege zur pharmakologischen MMP-Inhibition gesucht. Zunächst wurden Breitspektruminhibitoren später selektive MMP-Inhibitoren untersucht. Studien zu Breitspektruminhibitoren von MMP konnten am Tiermodell eine Reduktion der linksventrikulären Dilatation sowie eine verbesserte linksventrikuläre Funktion zeigen (Spinale 2007). Nachdem diese Wirkung am Tiermodell unter Verwendung selektiver MMP-Inhibitoren verifiziert werden konnte, wurden klinische Studien zur selektiven MMP-Inhibition durchgeführt (King et al. 2003). In der PREMIER-Studie (*Prevention of myocardial infarction early remodeling-study*) wurde der Einfluss einer selektiven MMP-Inhibition auf linksventrikuläre *Remodelling*prozesse untersucht. Leider konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden (Hudson et al. 2006). Dieses

Ergebnis unterstreicht zum einen die Schwierigkeit, Ergebnisse aus Tier- oder *in-vitro* Studien auf klinische Studien zu übertragen, sowie zum anderen die Komplexität des MMP-Systems. Es existieren *in-vitro* Studien zum menschlichen kardialen FB, in denen gezeigt werden konnte, dass eine chronische Exposition kardialer FB gegenüber MMP-Inhibitoren eine Zunahme der MMP-Synthese, im speziellen von MMP-9, zur Folge hat (Chapman et al. 2003; Maquoi et al. 2002). Weiterhin bewirkt die Beeinflussung neurohormonaler und inflammatorischer Vorgänge sowie eine Veränderung der mechanischen Beanspruchung der Ventrikel eine Reduktion der MMP-Spiegel. Dazu wurden eine Reihe von Tierstudien mit vielversprechenden Ergebnissen durchgeführt (Spinale 2007). Klinische Studien zur expliziten pharmakologischen Beeinflussung einer oder mehrerer MMPs existieren hingegen zum aktuellen Stand der Wissenschaft noch nicht. Hierzu fehlen noch Erkenntnisse zur Expression im Serum sowie im Gewebe als auch zu den komplexen Interaktionen mit anderen EZM-Komponenten während des kardialen *Remodellings*. Unumstritten spielen MMPs eine wichtige Rolle während der Fibrosierungsprozesse am Herzen und eignen sich möglicherweise deshalb auf zellulärer Ebene in diese einzugreifen.

Die erhöhte Nachweisbarkeit von ED-A⁺-Fn, B⁺ Tn-C, TIMP-1, MMP-9 und ASMA-positiven Zellen als Hinweis auf aggressiv ablaufende kardiale *Remodelling*prozesse bereits früh im Krankheitsprozess reflektiert die der Herzerkrankung zu Grunde liegenden Prozesse im Gewebe. Das NYHA-Stadium und die LVEF geben darüber nur indirekt Auskunft. Sie beschreiben eher die linksventrikuläre Funktionsstörung bei bereits stattgefundenen Gewebeschädigung.

Wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben wurde, zeigen sowohl ED-A⁺-Fn als auch B⁺ Tn-C oder andere Tn-C-Varianten ein bestimmtes Verteilungsmuster im kardialen Gewebe (Franz et al. 2010a). Beide onkofetalen Proteine findet man nicht im gesundem kardialen Gewebe, sondern sie zeigen eine klare krankheitsassoziierte Reexpression, weshalb sie sich als Biomarker kardiovaskulärer Erkrankungen eignen (Gabler et al. 1996; Golledge et al. 2011; Willems et al. 1996) (Astrof & Hynes 2009; Franz et al. 2011a; Franz et al. 2010b; Okamoto et al. 2012). Die beschriebene Korrelation zwischen der hohen lokalen und systemischen Expression von Tn-C-Varianten und einer verringerten Herzfunktion hat zunehmend das wissenschaftliche Interesse auf bildgebende Verfahren im Zusammenhang mit Tn-C gelenkt. Sato et al. veröffentlichten eine Studie zur intravenösen Applikation von mit ¹¹¹Indium-markierten

Anti-Tn-C-Antikörpern bei Ratten mit Myokarditis. Das Verteilungsmuster von Tn-C konnte örtlich und zeitlich nachvollzogen werden. Besonders in den entzündlichen kardialen Läsionen konnte mittels *Single-Photon-Emissions-CT* eine Akkumulation der markierten Tn-C-Antikörper nachgewiesen werden (Sato et al. 2002). Ähnliche Studien zur räumlich-zeitlichen Detektion von radioaktiv markierten Tn-C-Antikörpern wurden durch die Arbeitsgruppen um Taki und Odaka durchgeführt (Odaka et al. 2008; Taki et al. 2010). Basierend auf diesen Ergebnissen erscheinen immunszintigraphische bildgebende Verfahren als auch die Messung von Tn-C-Varianten im Serum als neue nicht-invasive Herangehensweisen in der Diagnostik kardialer Erkrankungen und zur Beurteilung von deren Aktivität vielversprechend (Midwood et al. 2011). MMP-9 und TIMP-1 eignen sich, wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erläutert, als Biomarker zur Beschreibung zum einen der Krankheitsaktivität und zum anderen der Krankheitsschwere kardiovaskulärer Erkrankungen (Collier et al. 2011; Hellenthal et al. 2012; Kato et al. 2012; Kobayashi et al. 2011; Marchesi et al. 2012; Reddy et al. 2004). Einschränkungen wie bisher fehlende serielle Messungen oder fehlende Referenzwerte müssen hierbei berücksichtigt werden. Auch für MMPs wurden nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Darstellung der Krankheitsaktivität untersucht. So konnten im Tiermodell MMPs unter Verwendung von In^{111} markierten Radiotracerⁿ, welche in der Lage sind, an MMPs zu binden, nachgewiesen werden (Su et al. 2005). Auch unter Berücksichtigung weiterer, hier nicht erwähnter Studien, eignen sich diese bildgebenden Verfahren als neue nicht-invasive Methoden zur Diagnostik und Charakterisierung kardiovaskulärer Erkrankungen.

7. Schlussfolgerungen

Veränderungen im Netzwerk der EZM im Rahmen des kardialen *Remodellings* haben wesentlichen Einfluß auf die Herzfunktion.

Vor diesem Hintergrund können einzelne Komponenten der EZM eine Einschränkung der Herzfunktion widerspiegeln und bereits in frühen Krankheitsstadien eine Aussage über die Prognose des Patienten treffen.

Herkömmliche histopathologische Marker der myokardialen Schädigung, wie Fibrose, Inflammation und der Nachweis viralen Genoms, treten auf der Basis dieser Erkenntnisse in den Hintergrund, da deren Nachweisbarkeit keinen relevanten Zusammenhang zur Prognose des DCM-Patienten aufzeigt.

Daraus ableitend kann hinsichtlich der DCM-Diagnostik ein Perspektivwechsel weg von den bisherigen histopathologischen Kriterien einer Herzschrägung hin zu einzelnen Komponenten der EZM empfohlen werden.

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Nachweisbarkeit von B⁺ Tn-C, ED-A⁺-Fn und ASMA-positiven Zellen im Herzgewebe sowie von B⁺ Tn-C, MMP-9 und TIMP-1 im Serum von DCM-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und deren Prognose demonstriert werden.

Die vermehrte Nachweisbarkeit dieser Parameter scheint die Intensität der zu genau diesem Zeitpunkt ablaufenden *Remodelling*prozesse im Rahmen der Krankheitsdynamik zu reflektieren. Diese Intensität steht offenbar in einem starken Zusammenhang mit der Krankheitsprogredienz, woraus sich die prognostische Relevanz ergibt.

Darüber hinaus ergeben sich aus der Existenz humaner rekombinanter Antikörper mit Spezifität gegen die untersuchten EZM-Komponenten neue Perspektiven für eine zielgerichtete Diagnostik und Therapie der DCM. So können diese Antikörper an diagnostische (z.B. Radionuklide) oder auch therapeutische (z.B. Zytokine oder klassische Medikamente) Agenzien gekoppelt werden und diese dann, im Sinne eines Vehikels, direkt an den Ort der Erkrankung transferieren. Dadurch kann zum einen eine hohe lokale Wirkeffizienz und zum anderen eine Reduktion unerwünschter systemischer Wirkungen erreicht werden.

8. Literatur

- Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987; 18:619-24.
- Arslan F, Smeets MB, Riem Vis PW et al. Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circ Res* 2011; 108:582-92.
- Aso N, Tamura A, Nasu M. Circulating tenascin-C levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2004; 94:1468-70.
- Assomull RG, Prasad SK, Lyne J et al. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1977-85.
- Astrof S, Crowley D, Hynes RO. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev Biol* 2007; 311:11-24.
- Astrof S, Hynes RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; 12:165-75.
- Ausma J, Cleutjens J, Thone F et al. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995; 147:35-42.
- Babaev VR, Porro F, Linton MF et al. Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis* 2008; 197:534-40.
- Badorff C, Knowlton KU. Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193:121-6.
- Baldinger A, Brehm BR, Richter P et al. Comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C expression in right atrial auricular and left ventricular human cardiac tissue from patients with coronary artery disease and aortic valve stenosis. *Histochem Cell Biol* 2011; 135:427-41.
- Balza E, Siri A, Ponassi M et al. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. *FEBS Lett* 1993; 332:39-43.
- Baudino TA, Carver W, Giles W et al. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H1015-26.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R et al. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5112-6.
- Bello D, Shah DJ, Farah GM et al. Gadolinium cardiovascular magnetic resonance predicts reversible myocardial dysfunction and remodeling in patients with heart failure undergoing beta-blocker therapy. *Circulation* 2003; 108:1945-53.
- Berndt A, Anger K, Richter P et al. Differential expression of tenascin-C splicing domains in urothelial carcinomas of the urinary bladder. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132:537-46.
- Berndt A, Borsi L, Hyckel P et al. Fibrillary co-deposition of laminin-5 and large unspliced tenascin-C in the invasive front of oral squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:286-92.
- Berndt A, Kosmehl H, Katenkamp D et al. Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. *Pathobiology* 1994; 62:55-8.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107:1579-85.
- Booth AJ, Wood SC, Cornett AM et al. Recipient-derived EDA fibronectin promotes cardiac allograft fibrosis. *J Pathol* 2012; 226:609-18.

Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E et al. Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol* 1993; 33:40-5.

Borsi L, Balza E, Carnemolla B et al. Selective targeted delivery of TNF α to tumor blood vessels. *Blood* 2003; 102:4384-92.

Borsi L, Carnemolla B, Nicolo G et al. Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 1992; 52:688-92.

Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48:474-82.

Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358:2148-59.

Brilla CG, Reams GP, Maisch B et al. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl J:57-61.

Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101:558-69.

Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S et al. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H518-25.

Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD et al. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:657-87.

Butler GS, Will H, Atkinson SJ et al. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; 244:653-7.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005; 65:40-51.

Camelliti P, Green CR, Kohl P. Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv Cardiol* 2006; 42:132-49.

Camelliti P, Green CR, LeGrice I et al. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 2004; 94:828-35.

Carnemolla B, Balza E, Siri A et al. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 1989; 108:1139-48.

Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M et al. Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol* 1999; 154:1345-52.

Casi G, Neri D. Antibody-drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives. *J Control Release* 2012; 161:422-8.

Catena C, Colussi G, Brosolo G et al. Aldosterone and aldosterone antagonists in cardiac disease: what is known, what is new. *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2:50-7.

Chancey AL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H2152-8.

Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 1990; 67:787-94.

Chapman RE, Scott AA, Deschamps AM et al. Matrix metalloproteinase abundance in human myocardial fibroblasts: effects of sustained pharmacologic matrix metalloproteinase inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:539-48.

Chauhan AK, Iaconcig A, Baralle FE et al. Alternative splicing of fibronectin: a mouse model demonstrates the identity of in vitro and in vivo systems and the processing autonomy of regulated exons in adult mice. *Gene* 2004; 324:55-63.

Chen K, Li D, Zhang X et al. Anoxia-reoxygenation stimulates collagen type-I and MMP-1 expression in cardiac fibroblasts: modulation by the PPAR-gamma ligand pioglitazone. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:682-7.

Chiquet M, Gelman L, Lutz R et al. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:911-20.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:986-90.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 1995; 51:853-62.

Chiquet-Ehrismann R, Hagios C, Matsumoto K. The tenascin gene family. *Perspect Dev Neurobiol* 1994; 2:3-7.

Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA et al. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 1986; 47:131-9.

Chiquet-Ehrismann R, Matsuoka Y, Hofer U et al. Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 1991; 2:927-38.

Chung CY, Zardi L, Erickson HP. Binding of tenascin-C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J Biol Chem* 1995; 270:29012-7.

Chuong CM, Chen HM. Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am J Pathol* 1991; 138:427-40.

Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 2005; 352:1539-49.

Collier P, Watson CJ, Voon V et al. Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *Eur J Heart Fail* 2011; 13:1087-95.

Contard F, Koteliensky V, Marotte F et al. Specific alterations in the distribution of extracellular matrix components within rat myocardium during the development of pressure overload. *Lab Invest* 1991; 64:65-75.

Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1914-31.

Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 2000; 5:119-30.

Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 1999; 84:1223-33.

D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001; 85:499-504.

D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004; 101:113-29.

Dandel M, Wallukat G, Potapov E et al. Role of beta(1)-adrenoceptor autoantibodies in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Immunobiology* 2012; 217:511-20.

Dandel M, Weng Y, Siniawski H et al. Prediction of cardiac stability after weaning from left ventricular assist devices in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2008; 118:S94-105.

de Haas HJ, van den Borne SW, Boersma HH et al. Evolving role of molecular imaging for new understanding: targeting myofibroblasts to predict remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1254:33-41.

Deenadayalan A, Heaslip D, Rajendiran AA et al. Immunoproteomic identification of human T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis* that differentiate healthy contacts from tuberculosis patients. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9:538-49.

Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E et al. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest* 1997; 100:253-8.

Desmouliere A, Redard M, Darby I et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146:56-66.

Diaz RA, Obasohan A, Oakley CM. Prediction of outcome in dilated cardiomyopathy. *Br Heart J* 1987; 58:393-9.

Diez J, Querejeta R, Lopez B et al. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 2002; 105:2512-7.

Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51:600-6.

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48:504-11.

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77:863-8.

Ebihara I, Nakamura T, Shimada N et al. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:544-50.

Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 1992; 87 Suppl 2:183-9.

Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res* 1991; 69:483-90.

Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 2000; 84:106-12.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29:270-6.

Ergul A, Walker CA, Goldberg A et al. ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H2050-6.

Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:869-76.

Fan D, Takawale A, Lee J et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5:15.

Fatkin D. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* 2011; 20:691-3.

Felkin LE, Lara-Pezzi E, George R et al. Expression of extracellular matrix genes during myocardial recovery from heart failure after left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28:117-22.

Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF et al. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 1989; 109:903-14.

Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR et al. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82:809-20.

Frangogiannis NG. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem* 2006; 13:1877-93.

Franz M, Berndt A, Altendorf-Hofmann A et al. Serum levels of large tenascin-C variants, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2009; 11:1057-62.

Franz M, Berndt A, Grun K et al. Expression of extra domain A containing fibronectin in chronic cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2011a; 30:86-94.

Franz M, Brehm BR, Richter P et al. Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Histol* 2010a; 41:39-50.

Franz M, Grun K, Richter P et al. Extra cellular matrix remodelling after heterotopic rat heart transplantation: gene expression profiling and involvement of ED-A+ fibronectin, alpha-smooth muscle actin and B+ tenascin-C in chronic cardiac allograft rejection. *Histochem Cell Biol* 2010b; 134:503-17.

Franz M, Hansen T, Borsi L et al. A quantitative co-localization analysis of large unspliced tenascin-C(L) and laminin-5/gamma2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:6-11.

Franz M, Neri D, Berndt A. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies. *J Pathol* 2012; 226:557-61.

Franz M, Neri D, Berndt A. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies. *J Pathol* 2011b.

Fries KM, Blieden T, Looney RJ et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72:283-92.

Fujimoto N, Onishi K, Sato A et al. Incremental prognostic values of serum tenascin-C levels with blood B-type natriuretic peptide testing at discharge in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. *J Card Fail* 2009; 15:898-905.

Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y et al. Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer Res* 2002; 62:5603-10.

Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1863-7.

Gabbiani G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 1996; 192:708-11.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200:500-3.

Gabler U, Berndt A, Kosmehl H et al. Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart* 1996; 75:358-62.

George EL, Baldwin HS, Hynes RO. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* 1997; 90:3073-81.

George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS et al. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 1993; 119:1079-91.

Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV et al. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol* 1989; 109:357-66.

Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO et al. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn* 2004; 230:787-94.

Golledge J, Clancy P, Maguire J et al. The role of tenascin C in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011; 92:19-28.

Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 194:3-21.

Graham HK, Trafford AW. Spatial disruption and enhanced degradation of collagen with the transition from compensated ventricular hypertrophy to symptomatic congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:H1364-72.

Grimm D, Huber M, Jabusch HC et al. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:487-501.

Grobe JL, Der Sarkissian S, Stewart JM et al. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113:357-64.

Gulati A, Jabbour A, Ismail TF et al. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013; 309:896-908.

Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R et al. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 1996; 148:1639-48.

Gupta V, Grande-Allen KJ. Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res* 2006; 72:375-83.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453:314-21.

Hagios C, Koch M, Spring J et al. Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J Cell Biol* 1996; 134:1499-512.

Hall MC, Young DA, Waters JG et al. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 2003; 278:10304-13.

Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E et al. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 73:10-5.

Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64:1235-45.

Heimer R, Bashey RI, Kyle J et al. TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2191-8.

Hein S, Arnon E, Kostin S et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003; 107:984-91.

Heling A, Zimmermann R, Kostin S et al. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res* 2000; 86:846-53.

Hellenthal FA, Ten Bosch JA, Pulinx B et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9: a possible diagnostic marker of successful endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012; 43:171-2.

Hermida N, Lopez B, Gonzalez A et al. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2009; 81:601-9.

Hernnas J, Nettelbladt O, Bjermer L et al. Alveolar accumulation of fibronectin and hyaluronan precedes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Eur Respir J* 1992; 5:404-10.

Herpel E, Pritsch M, Koch A et al. Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology* 2006; 48:736-47.

Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med* 2010; 12:655-67.

Herskowitz A, Ahmed-Ansari A, Neumann DA et al. Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis: a nonhistologic marker of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:624-32.

Hessel MH, Bleeker GB, Bax JJ et al. Reverse ventricular remodelling after cardiac resynchronization therapy is associated with a reduction in serum tenascin-C and plasma matrix metalloproteinase-9 levels. *Eur J Heart Fail* 2007; 9:1058-63.

Heymans S, Schroen B, Vermeersch P et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation* 2005; 112:1136-44.

Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 2005; 280:26641-4.

Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W et al. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:15-20.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110:673-87.

Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T et al. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest* 2001; 81:1015-24.

Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yasutomi Y et al. Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis. *J Pathol* 2002; 197:388-94.

Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol* 2004; 19:517-25.

Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M et al. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation* 2003; 71:291-8.

Iraqi W, Rossignol P, Angioi M et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart

failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009; 119:2471-9.

Ismail TF, Prasad SK, Pennell DJ. Prognostic importance of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in cardiomyopathy. *Heart* 2012; 98:438-42.

Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C et al. The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail Rev* 2000; 5:239-50.

Janicki JS, Brower GL, Gardner JD et al. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail Rev* 2004; 9:33-42.

Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE et al. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994; 127:2037-48.

Jian B, Jones PL, Li Q et al. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* 2001; 159:321-7.

Joffs C, Gunasinghe HR, Multani MM et al. Cardiopulmonary bypass induces the synthesis and release of matrix metalloproteinases. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:1518-23.

Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 1996; 12:1259-67.

Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3:1-30.

Kalembeyi I, Inada H, Nishiura R et al. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer* 2003; 105:53-60.

Kania G, Blyszczuk P, Stein S et al. Heart-infiltrating prominin-1+/CD133+ progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor beta-mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 2009; 105:462-70.

Kanzaki Y, Terasaki F, Okabe M et al. Myocardial inflammatory cell infiltrates in cases of dilated cardiomyopathy as a determinant of outcome following partial left ventriculectomy. *Jpn Circ J* 2001; 65:797-802.

Kato TS, Chokshi A, Singh P et al. Markers of extracellular matrix turnover and the development of right ventricular failure after ventricular assist device implantation in patients with advanced heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31:37-45.

Kim H, Yoon CS, Rah B. Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct* 1999; 24:19-26.

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R et al. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118:639-48.

King MK, Coker ML, Goldberg A et al. Selective matrix metalloproteinase inhibition with developing heart failure: effects on left ventricular function and structure. *Circ Res* 2003; 92:177-85.

Klappacher G, Franzen P, Haab D et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:913-8.

Klotz S, Foronjy RF, Dickstein ML et al. Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness. *Circulation* 2005; 112:364-74.

Kobayashi N, Hata N, Kume N et al. Matrix metalloproteinase-9 for the earliest stage acute coronary syndrome. *Circ J* 2011; 75:2853-61.

Kohan M, Muro AF, White ES et al. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to $\alpha 4 \beta 7$ integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *FASEB J* 2010; 24:4503-12.

Kohl P, Camelliti P, Burton FL et al. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol* 2005; 38:45-50.

Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 1996; 429:311-22.

Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 2010; 225:631-7.

Kueth F, Braun RK, Foerster M et al. Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathy. Evidence for the role of TH2-type CD4⁺T lymphocytes and association with myocardial HLA-DR expression. *J Clin Immunol* 2006; 26:33-9.

Kueth F, Lindner J, Matschke K et al. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1660-6.

Kueth F, Sigusch HH, Hilbig K et al. Detection of viral genome in the myocardium: lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 2007; 153:850-8.

Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B et al. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 1994; 1:13-25.

Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111:887-93.

Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991; 138:1257-65.

Kuhn H, Lawrenz T, Beer G. [Indication for myocardial biopsy in myocarditis and dilated cardiomyopathy]. *Med Klin (Munich)* 2005; 100:553-61.

Kuckack J, Prusa R, Kotaska K et al. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005; 149:225-36.

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002; 106:130-5.

Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J* 2005; 26:27-35.

Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 2010; 106:1675-80.

Lechat P, Packer M, Chalon S et al. Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation* 1998; 98:1184-91.

Leprini A, Querze G, Zardi L. Tenascin isoforms: possible targets for diagnosis and therapy of cancer and mechanisms regulating their expression. *Perspect Dev Neurobiol* 1994; 2:117-23.

Leyva F, Taylor RJ, Foley PW et al. Left ventricular midwall fibrosis as a predictor of mortality and morbidity after cardiac resynchronization therapy in patients with nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60:1659-67.

Li YY, Feldman AM, Sun Y et al. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998; 98:1728-34.

Li YY, Feng Y, McTiernan CF et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation* 2001; 104:1147-52.

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 46:214-24.

Lombes M, Alfaidy N, Eugene E et al. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 1995; 92:175-82.

Looi JL, Edwards C, Armstrong GP et al. Characteristics and prognostic importance of myocardial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy assessed by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging. *Clin Med Insights Cardiol* 2010; 4:129-34.

Lotze U, Heinke S, Fritzenwanger M et al. Carvedilol inhibits platelet-derived growth factor-induced signal transduction in human cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39:576-89.

Lovelock JD, Baker AH, Gao F et al. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H461-8.

Luk A, Ahn E, Soor GS et al. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol* 2009a; 62:219-25.

Luk A, Metawee M, Ahn E et al. Do clinical diagnoses correlate with pathological diagnoses in cardiac transplant patients? The importance of endomyocardial biopsy. *Can J Cardiol* 2009b; 25:e48-54.

MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35:30-4.

MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 2000; 46:257-63.

Maisel A, Mueller C, Adams K, Jr. et al. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 2008; 10:824-39.

Makino N, Sugano M, Satoh S et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44:65-71.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002; 91:1103-13.

Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R et al. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop). *Am J Cardiol* 1992; 69:1458-66.

Maquoi E, Munaut C, Colige A et al. Stimulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human fibrosarcoma cells by synthetic matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp Cell Res* 2002; 275:110-21.

Marchesi C, Dentali F, Nicolini E et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2012; 30:3-16.

Markowitz M, Messineo F, Coplan NL. Aldosterone receptor antagonists in cardiovascular disease: a review of the recent literature and insight into potential future indications. *Clin Cardiol* 2012; 35:605-9.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113:1807-16.

Masci PG, Schuurman R, Andrea B et al. Myocardial fibrosis as a key determinant of left ventricular remodeling in idiopathic dilated cardiomyopathy: a contrast-enhanced cardiovascular magnetic study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013; 6:790-9.

Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* 2003; 60:5-10.

Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K et al. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res* 1999; 85:1046-55.

Midwood KS, Hussenet T, Langlois B et al. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:3175-99.

Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 2009; 3:287-310.

Mighell AJ, Thompson J, Hume WJ et al. Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Cancer* 1997; 72:236-40.

Milting H, Ellinghaus P, Seewald M et al. Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:589-96.

Mollmann H, Nef HM, Kostin S et al. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc Res* 2006; 71:661-71.

Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S et al. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol* 2005; 205:460-7.

Mukherjee D, Sen S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1991; 88:1141-6.

Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 2003; 162:149-60.

Muro AF, Moretti FA, Moore BB et al. An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:638-45.

Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I et al. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 1991; 115:1127-36.

Nabeta T, Inomata T, Iida Y et al. Baseline cardiac magnetic resonance imaging versus baseline endomyocardial biopsy for the prediction of left ventricular reverse remodeling and prognosis in response to therapy in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels* 2013.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378:151-60.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69:562-73.

Nakamura T, Ebihara I, Shimada N et al. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta* 1998; 276:173-7.

Neumann T, Biermann J, Erbel R et al. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106:269-75.

Nicolo G, Salvi S, Oliveri G et al. Expression of tenascin and of the ED-B containing oncofetal fibronectin isoform in human cancer. *Cell Differ Dev* 1990; 32:401-8.

Nishioka T, Suzuki M, Onishi K et al. Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 49:261-8.

Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:380-4.

Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H et al. Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR478-87.

Odaka K, Uehara T, Arano Y et al. Noninvasive detection of cardiac repair after acute myocardial infarction in rats by 111 In Fab fragment of monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Int Heart J* 2008; 49:481-92.

Okamoto H, Imanaka-Yoshida K. Matricellular proteins: new molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc Ther* 2012; 30:e198-209.

Okuno T, Takahashi K, Balachandra K et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 1989; 27:651-3.

Olbrich HG. Epidemiologie - Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie. 2001:12-19.

Oliviero P, Chassagne C, Salichon N et al. Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovasc Res* 2000; 46:346-55.

Orend G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1066-83.

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99:2750-6.

Peacock JD, Lu Y, Koch M et al. Temporal and spatial expression of collagens during murine atrioventricular heart valve development and maintenance. *Dev Dyn* 2008; 237:3051-8.

Pelouch V, Dixon IM, Golfman L et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 1993; 129:101-20.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; 39:258-63.

Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348:1309-21.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341:709-17.

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; 123:255-78.

Potier M, Karl M, Elliot SJ et al. Response to sex hormones differs in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E1237-45.

Ramos DM, Chen B, Regezi J et al. Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75:680-7.

Reddy HK, Tjahja IE, Campbell SE et al. Expression of matrix metalloproteinase activity in idiopathic dilated cardiomyopathy: a marker of cardiac dilatation. *Mol Cell Biochem* 2004; 264:183-91.

Reinhardt D, Sigusch HH, Hensse J et al. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart* 2002; 88:525-30.

Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44:672-3.

Richardson P, McKenna W, Bristow M et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841-2.

Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:345-55.

Romberger DJ. Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:939-43.

Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ et al. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345:1435-43.

Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P et al. Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail* 1999; 1:337-52.

Rowan RA, Masek MA, Billingham ME. Ultrastructural morphometric analysis of endomyocardial biopsies. Idiopathic dilated cardiomyopathy, anthracycline cardiotoxicity, and normal myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1988; 2:137-44.

Rybak JN, Roesli C, Kaspar M et al. The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases. *Cancer Res* 2007; 67:10948-57.

Saga Y, Yagi T, Ikawa Y et al. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 1992; 6:1821-31.

Samuel JL, Barrieux A, Dufour S et al. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs during the development of rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Clin Invest* 1991; 88:1737-46.

Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K et al. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:2319-25.

Sato H, Takino T, Okada Y et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370:61-5.

Sato I, Shimada K. Quantitative analysis of tenascin in chordae tendineae of human left ventricular papillary muscle with aging. *Ann Anat* 2001; 183:443-8.

Sato M, Toyozaki T, Odaka K et al. Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by ¹¹¹In monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Circulation* 2002; 106:1397-402.

Schenk T, Enders M, Pollak S et al. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J Clin Microbiol* 2009; 47:106-10.

Schliemann C, Neri D. Antibody-based vascular tumor targeting. *Recent Results Cancer Res* 2010; 180:201-16.

Schoen F. *The heart*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2005.

Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B et al. Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2002; 4:439-4.

Schwarzbauer JE. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:786-91.

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998; 142:873-81.

Shah PM. Echocardiography in congestive or dilated cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr* 1988; 1:20-30.

Shanes JG, Ghali J, Billingham ME et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75:401-5.

Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M et al. The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 2004; 108:173-80.

Siri A, Carnemolla B, Saginati M et al. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:525-31.

Siri A, Knauper V, Veirana N et al. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1995; 270:8650-4.

Smith RS, Smith TJ, Blieden TM et al. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997; 151:317-22.

Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 2009; 105:1164-76.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90:520-30.

Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007; 87:1285-342.

Spinale FG, Coker ML, Bond BR et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000a; 46:225-38.

Spinale FG, Coker ML, Heung LJ et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000b; 102:1944-9.

Spinale FG, Coker ML, Krombach SR et al. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res* 1999; 85:364-76.

Spinale FG, Coker ML, Thomas CV et al. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 1998; 82:482-95.

Stewart JA, Jr., Wei CC, Brower GL et al. Cardiac mast cell- and chymase-mediated matrix metalloproteinase activity and left ventricular remodeling in mitral regurgitation in the dog. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:311-9.

Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:634-40.

Su H, Spinale FG, Dobrucki LW et al. Noninvasive targeted imaging of matrix metalloproteinase activation in a murine model of postinfarction remodeling. *Circulation* 2005; 112:3157-67.

Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000; 46:250-6.

Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004a; 109:2850-6.

Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J* 2004b; 25:1509-16.

Swan HJ. Left ventricular dysfunction in ischemic heart disease: fundamental importance of the fibrous matrix. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994; 8 Suppl 2:305-12.

Taki J, Inaki A, Wakabayashi H et al. Dynamic expression of tenascin-C after myocardial ischemia and reperfusion: assessment by 125I-anti-tenascin-C antibody imaging. *J Nucl Med* 2010; 51:1116-22.

Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K et al. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol* 2005; 167:71-80.

Tan MH, Sun Z, Opitz SL et al. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis. *Blood* 2004; 104:11-8.

Tan SM, Zhang Y, Connelly KA et al. Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298:H1415-25.

Tayebjee MH, Lip GY, Blann AD et al. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb Res* 2005; 115:205-10.

Terasaki F, Okabe M, Hayashi T et al. Myocardial inflammatory cell infiltrates in cases of dilated cardiomyopathy: light microscopic, immunohistochemical, and virological analyses of myocardium specimens obtained by partial left ventriculectomy. *J Card Surg* 1999; 14:141-6.

Terasaki F, Okamoto H, Onishi K et al. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2007; 71:327-30.

Thomas CV, Coker ML, Zellner JL et al. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; 97:1708-15.

Trachsel E, Neri D. Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:735-54.

Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 1994; 5:439-53.

Tsouli SG, Liberopoulos EN, Goudevenos JA et al. Should a statin be prescribed to every patient with heart failure? *Heart Fail Rev* 2008; 13:211-25.

Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H et al. High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: expression of tenascin C as a possible marker for inflammation. *Hum Pathol* 2009; 40:1015-22.

Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:888-92.

Tucker RP, Spring J, Baumgartner S et al. Novel tenascin variants with a distinctive pattern of expression in the avian embryo. *Development* 1994; 120:637-47.

Tyagi SC, Kumar SG, Alla SR et al. Extracellular matrix regulation of metalloproteinase and antiproteinase in human heart fibroblast cells. *J Cell Physiol* 1996; 167:137-47.

Ulrich MM, Janssen AM, Daemen MJ et al. Increased expression of fibronectin isoforms after myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2533-43.

Uria JA, Jimenez MG, Balbin M et al. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273:9769-77.

van Amerongen MJ, Bou-Gharios G, Popa E et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *J Pathol* 2008; 214:377-86.

Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F et al. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int J Dev Biol* 2011; 55:511-25.

Villa A, Trachsel E, Kaspar M et al. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer* 2008; 122:2405-13.

Villar AV, Cobo M, Llano M et al. Plasma levels of transforming growth factor-beta1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis. *PLoS One* 2009; 4:e8476.

Villarreal F, Zimmermann S, Makhsudova L et al. Modulation of cardiac remodeling by adenosine: in vitro and in vivo effects. *Mol Cell Biochem* 2003; 251:17-26.

Villarreal FJ, Lee AA, Dillmann WH et al. Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:735-42.

Walker GA, Masters KS, Shah DN et al. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 2004; 95:253-60.

Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med* 1999; 341:753-5.

Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:1637-52.

Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 2004; 22:47-50.

Weber KT. Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* 1997; 96:2488-92.

Weber KT, Pick R, Jalil JE et al. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21 Suppl 5:121-31.

Weber KT, Pick R, Janicki JS et al. Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. *Am Heart J* 1988; 116:1641-6.

White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol* 2008; 216:1-14.

White ES, Muro AF. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* 2011; 63:538-46.

Wight TN, Potter-Perigo S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301:G950-5.

Wilke A, Schonian U, Herzum M et al. [The extracellular matrix and cytoskeleton of the myocardium in cardiac inflammatory reaction]. *Herz* 1995; 20:95-108.

Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J Pathol* 1996; 179:321-5.

Willems IE, Havenith MG, De Mey JG et al. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 1994; 145:868-75.

Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:388-403.

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J et al. Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. *Eur Heart J* 1998; 19:1564-72.

Woolf AD, Campion GV, Chishick A et al. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med* 1989; 149:1153-6.

Wu KC, Weiss RG, Thiemann DR et al. Late gadolinium enhancement by cardiovascular magnetic resonance heralds an adverse prognosis in nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:2414-21.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214:199-210.

Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP et al. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274:21840-6.

Yan AT, Yan RT, Spinale FG et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006; 12:514-9.

Yoshida T, Matsumoto E, Hanamura N et al. Co-expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol* 1997; 182:421-8.

Zamilpa R, Lopez EF, Chiao YA et al. Proteomic analysis identifies in vivo candidate matrix metalloproteinase-9 substrates in the left ventricle post-myocardial infarction. *Proteomics* 2010; 10:2214-23.

Zannad F, Alla F, Dousset B et al. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000; 102:2700-6.

Zannad F, McMurray JJ, Krum H et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011; 364:11-21.

Zardi L, Carnemolla B, Siri A et al. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987; 6:2337-42.

Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2010; 107:1304-12.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13:952-61.

Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304:C216-25.

9. Anhang

9.1 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Marcus Franz für die Überlassung des interessanten Themas meiner Arbeit, die stets freundliche und kompetente Betreuung sowie die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat. Alexander Berndt für die Möglichkeit danken, einen wesentlichen Teil meiner experimentellen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Iver Petersen) des Universitätsklinikums Jena durchführen zu können.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans R. Figulla, dem Direktor der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena, für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit an seiner Klinik verwirklichen zu können.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Mall (Institut für Pathologie des Klinikums Darmstadt) sowohl für die histopathologische Bewertung der Herzmuskelbiopsien als auch für die Überlassung der klinischen Befunde zur wissenschaftlichen Verwendung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dario Neri (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich), für die Bereitstellung des SIP-F8-Antikörpers sowie für die wohlwollende Unterstützung meiner Forschungsarbeiten.

Weiterhin danke ich der Unterstützung durch das EU-Projekt PRIAT (Profiling Responders in Antibody Therapy; European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013); grant agreement n° Health-F4-2012-305309). Die in

dieser Promotion durchgeführten Untersuchungen wurden in Teilen dadurch gefördert.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn PD Dr. med. Friedhelm Kueth (Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena) für die Bereitstellung der patientenbezogenen Daten im Rahmen des Studieneinschlusses und der Verlaufskontrollen.

Insbesondere möchte ich Frau Annett Schmidt (Labor Kardiologie, Forschungszentrum Lobeda, Universitätsklinikum Jena) für die Analyse der Serumproben sowie für die Anfertigung der histologischen Schnitte danken.

Dank schulde ich auch Frau Dr. R. Egerer (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Jena), die die Myokardbiopsien auf das Vorhandensein viralen Genoms hin untersuchte.

Für die Hilfe in allen statistischen Fragen möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Schlattmann (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena) bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Frau Dr. rer. nat. Katja Grün und Frau Dr. Petra Richter (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) für ihre Unterstützung bei der Analyse und Auswertung der experimentellen Daten.

Ich danke Frau Seliger (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) für die praktische Unterstützung bei meinen experimentellen Arbeiten.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Marcus Franz und PD Dr. med. Friedhelm Kütke, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers